

**Charakterisierung und Modulation der  
Lipidmediatorbiosynthese in humanen Makrophagen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Dipl.-Pharm. Markus Werner**

**geboren am 29.01.1987 in Saalfeld**

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Werz, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Gutachter: apl. Prof. Dr. Amelie Lupp, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. Verena Dirsch, Universität Wien

Annahme als Doktorand:	17.08.2015
Beginn experimenteller Arbeit:	08/2015
Ende experimenteller Arbeit:	03/2019
Einreichung der Dissertation:	28.05.2020
Disputation:	14.09.2020



## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Oliver Werz. Er schenkte mir sein Vertrauen und ermöglichte mir die Promotion am Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie in Jena. Dank seines ausgezeichnetem Lehrstuhlmanagements und seiner hervorragenden wissenschaftlichen Vernetzung war ein praktisch uneingeschränktes Arbeiten mit besten Geräten und Materialien sowie exzellenten Kooperationspartnern möglich. Weiterhin bedeuteten seine hochwertigen wissenschaftlichen Erkenntnisse und unser regelmäßiger und freundschaftlicher Dialog das Fundament für meine Forschungstätigkeit.

Prof. Dr. Andreas Koeberle möchte ich für die Einarbeitung in die UPLC-MS/MS basierte Analytik sowie die vielen hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen danken.

Bei Prof. Dr. Garscha möchte ich mich ebenfalls für den regelmäßigen und kritischen wissenschaftlichen Austausch bedanken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt den Freunden und Kollegen Erik Romp, Konstantin Löser, Helmut Pein, Stefanie König und Jana Fischer. Im Breitbandspektrum von produktiven Gesprächen an der Zellkulturbank bis hin zum privaten Cooldown bei Bratwurst und Bier auf der Dachterrasse haben sie die Promotionszeit unvergesslich schön gemacht.

Für die freundliche Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung danke ich weiterhin allen ehemaligen Kollegen am Lehrstuhl. Insbesondere danken möchte ich dabei Katrin, Nadja, Bärbel, Maria T., Anna, Laura, Jana, Simona, Hans, Paul, Konstantin N., Christian und Rao.

Ich möchte mich bei meinem Freund Jörg für die schöne Zeit während Studium und Promotion in Jena bedanken.

Der größte Dank gilt meiner gesamten Familie. Sie sind meine Wurzeln und meine Flügel. Sie sind bedingungslose Unterstützer. Ohne sie wäre dieser Weg nicht möglich gewesen. Wilhelm du bist meine Inspiration und Motivation. Maria du bist die Liebe in meinem Leben. Danke!

## INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG .....	I
INHALTSVERZEICHNIS .....	II
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
ZUSAMMENFASSUNG.....	VIII
SUMMARY .....	XI
1 EINLEITUNG .....	1
1.1 Immunologische Grundlagen.....	1
1.1.1 Entzündung im Rahmen der angeborenen und erworbenen Immunantwort.....	1
1.1.2 Das „Löschen der Flamme“ – Entzündungsauflösung .....	2
1.1.3 Immunantwort auf Tumorzellen – Immunoediting in drei Phasen.....	5
1.2 Krebs und Tumor-fördernde-Entzündung .....	5
1.3 Makrophagen .....	8
1.3.1 Makrophagen in der Immunantwort .....	8
1.3.2 Tumor-assoziierte-Makrophagen .....	9
1.4 Therapeutische Ansätze in der Krebstherapie .....	10
1.5 Lipidmediatoren .....	13
1.5.1 Lipidmediatoren – Biosynthese, Aktivität und Wirkstoffrelevanz.....	13
1.5.2 Lipidmediatoren im Krebsgeschehen.....	17
1.6 Testsysteme und Analytik der Lipidmediatoren.....	19
1.6.1 In-vitro- und in-vivo-Testsysteme der Lipidmediatorbiosynthese.....	20
1.6.2 Probenaufbereitung und Instrumentelle Analytik.....	22
2 ZIELSTELLUNG .....	24
3 MANUSKRIPTE.....	25
3.1 Manuskript I.....	26
3.2 Manuskript II.....	38
3.3 Manuskript III.....	53

4 DISKUSSION .....	68
4.1 Charakterisierung der Lipidmediatorbiosynthese durch verschiedene Stimuli in Makrophagen .....	69
4.2 Etablierung eines UPLC-MS/MS basierten Testsystems zur umfassenden Lipidmediatoranalytik und Charakterisierung komplexer Lipidmediator-Netzwerke für definierte pharmakologische Inhibitoren.....	73
4.2.1 Entwicklung einer UPLC-MS/MS Methode.....	74
4.2.2 COX-Inhibition .....	75
4.2.3 5-LO/FLAP-Inhibition .....	76
4.2.4 15-LO-1-Inhibition.....	78
4.2.5 cPLA <sub>2</sub> -Inhibition .....	80
4.2.6 Zusammenfassende Erkenntnisse aus den Inhibitorstudien .....	81
4.3 Die Kommunikation zwischen humanen Makrophagen und epithelialen Krebszellen schärft ein protumorales Lipidmediatorprofil.....	82
4.4 Schlusswort .....	87
LITERATURVERZEICHNIS.....	XIV
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....	XXI
APPENDIX 1: ERGÄNZENDE INFORMATIONEN.....	XXII
APPENDIX 1.1 Ergänzende Informationen zu Manuskript I.....	XXII
APPENDIX 1.2 Ergänzende Informationen zu Manuskript II.....	XXXI
APPENDIX 1.3 Ergänzende Informationen zu Manuskript III.....	XXXVIII
APPENDIX 2: AUTORENBEITRÄGE ZU DEN MANUSKRIPTE.....	XLIII
APPENDIX 3: LISTE DER WISSENSCHAFTLICHEN PUBLIKATIONEN .....	XLVI

## ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

<i>Abb. 1: Chronologie der Entzündung. ....</i>	<i>4</i>
<i>Abb. 2: Charakteristische Merkmale von Tumorgeweben.....</i>	<i>6</i>
<i>Abb. 3: Biosynthesewege prominenter Lipidmediatoren im Überblick. ....</i>	<i>14</i>
<i>Abb. 4: Typische MS/MS-Modi. ....</i>	<i>23</i>
<i>Abb. 5: Finaler UPLC-Fließmittel-Gradient. ....</i>	<i>74</i>
<i>Abb. 6: Ergebnisse – COX-Inhibition (vereinfachte Darstellung). ....</i>	<i>76</i>
<i>Abb. 7: Ergebnisse – 5-LO/FLAP-Inhibition (vereinfachte Darstellung). ....</i>	<i>77</i>
<i>Abb. 8: Ergebnisse – 15-LO-1-Inhibition (vereinfachte Darstellung). ....</i>	<i>79</i>
<i>Abb. 9: Ergebnisse – cPLA<sub>2</sub>-Inhibition (vereinfachte Darstellung). ....</i>	<i>80</i>
<i>Abb. 10: Ergebnisse der Inhibitorstudien (vereinfachte Darstellung). ....</i>	<i>81</i>
<i>Abb. 11: Die zellkontaktlose Kommunikation zwischen Makrophagen und epithelialen Krebszellen erhöht die Leukotrienbildungskapazität der Immunzellen durch eine Verstärkung der p38 MAPK - MAPKAPK-2 (MK-2) – Aktivierungsachse der 5-LO.....</i>	<i>85</i>
 <i>Tab. 1: Lipidmediatoren – Biosynthese, Rezeptoren und biologische Aktivitäten. ....</i>	 <i>15</i>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A549	epitheliale Lungenkrebszellen	FLAP	5-Lipoxygenase- aktivierendes Protein
AA	Arachidonsäure	fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl- Phenylalanin
AKt	Proteinkinase B	HDHA	Hydroxydocosahexaen- säure
APC	Antigen-präsentierende Zellen (antigen-presenting cells)	HEPE	Hydroxyeicosapentaen- säure
ASS	Acetylsalicylsäure	HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
ATP	Adenosintriphosphat	HL-60	promyeloische Blutkrebszellen
BLT	Leukotrien B <sub>4</sub> Rezeptor	HpETE	Hydroperoxyeicosatetraen- säure
cAMP	cyclisches Adenosinmono- phosphat	HPLC	Hochleistungs- flüssigkeitschromatografie (high performance liquid chromatography)
CD	Gruppe immunphäno- typischer Oberflächen- merkmale von Zellen (cluster of differentiation)	HT-29	epitheliale Darmkrebszellen
COX	Cyclooxygenasen	HUVEC	Endothelzellen der humanen Nabelschnur (umbilical vein endothelial cells)
cPLA <sub>2</sub>	zytosolische Phospholipase A <sub>2</sub> (cytosolic phospholipase A <sub>2</sub> )	IL	Interleukin
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte- associated Protein 4	IM-MS	Ionenmobilitäts- Massenspektrometrie
CYP	Cytochrom P450 Enzyme	IFN-γ	Interferon-gamma
DHA	Docosahexaensäure	LM	Lipidmediatoren
DNS	Desoxyribonukleinsäure	LO	Lipoxygenasen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	LPS	Lipopolysaccharide
EPA	Eicosapentaensäure		
ERK	extracellular-signal regulated kinases		

LT	Leukotrien	m/z	Masse/Ladung-Verhältnis eines ionisierten Analyten
LX	Lipoxin		
M1	M1-Makrophagen	NF-κB	nuclear factor 'kappa-light- chain-enhancer' of activated B-cells
M2	M2-Makrophagen		
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	NK Zellen	Natürliche Killerzellen
MAPKAPK-2	MAPK-aktivierte Proteinkinase 2	NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase (auch MAP2K oder MEK)	PAF	Plättchenaktivierender Faktor
MaR	Maresin	PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns)
M-CSF	Monozytenkolonien- stimulierender Faktor (macrophage colony- stimulating factor)	PD	Protektin
MDSC	Myeloide Suppressorzellen (myeloide-derived suppressor cells)	PD-1	programmed cell death protein 1
MHC	Haupthistokompatibilitäts- komplex (major histocompatibility complex)	PD-L1	programmed cell death 1 ligand 1
mPGES-1	mikrosomale Prostaglandin E Synthase 1	PD-L2	programmed cell death 1 ligand 2
MRM	multiple reaction monitoring	PFT	Poren-formende Toxine
MS/MS	Tandem- Massenspektrometrie	PG	Prostaglandin
mTOR	mechanistic target of Rapamycin	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
		PLA2	Phospholipase A2 Typ (Lipidhydrolyse typischer- weise an der sn-2 Position)
		PMNL	Granulozyten (polymorphonuclear leukocytes)

PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor	SRM	selected reaction monitoring
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids)	TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
Raf	(rat fibrosarcoma) Serin/Threonin-Proteinkinase	TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor beta (transforming growth factor beta)
Ras	kleines G-Protein des (rat sarcoma) Proto-Onkogen	TLR	Toll-like-Rezeptor
RP	Umkehrphase (reversed phase)	TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
Rv	Resolvin	TX	Thromboxan
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	UDP	Uridindiphosphat
SPM	specialized pro-resolving mediators	UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
		VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Pathophysiologie von verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen, Adipositas, Typ-2 Diabetes, Asthma, neurodegenerativer Krankheiten und Krebs ist häufig durch eine chronisch entzündliche Komponente gekennzeichnet. Aufgrund der hohen Prävalenz dieser Erkrankungen und des teilweise noch recht limitierten Behandlungserfolges, hat die Suche nach neuen Therapieoptionen höchste Priorität [1-3]. Die Manipulation verschiedener, aus Arachidonsäure (AA)-, Eicosapentaensäure (EPA)-, und Docosahexaensäure (DHA)-abgeleiteter pro- und antiinflammatorischer Lipidmediatoren (LM) ist dabei ein vielversprechender therapeutischer Ansatz. LM werden im Zusammenspiel von Phospholipasen (PLA<sub>2</sub>), Cyclooxygenasen (COX), Lipoxygenasen (LO), oder/ und CYP-Enzymen sowie verschiedener nachgeschalteter Enzyme biosynthetisiert. Eine Dysregulation dieser LM ist mit einer Vielzahl der oben benannten Erkrankungen assoziiert [4-7]. Etwas vereinfacht kann man den 5-LO-abhängigen Leukotrienen eher proinflammatorische, den vorwiegend 15-LO-abhängigen SPM (specialized pro-resolving mediators) vorwiegend antiinflammatorische und den COX-abhängigen Prostaglandinen immunmodulierende (pro- und antiinflammatorische) biologische Aktivitäten zuweisen [2, 5, 6, 8]. Mit dem Wissen, dass die Tumor-fördernde-Entzündung ein Motor vieler maligner Erkrankungen ist, lassen sich mit gewissen Einschränkungen für Leukotriene weiterhin eher protumorale und für SPM dagegen antitumorale Eigenschaften ableiten. Für Prostaglandine ergibt sich ein vorwiegend protumorales Wirkspektrum. Für letztere überwiegen unter anderem die immunsuppressiven und damit die frühe Tumoreliminierung störenden Aktivitäten [8-13].

Aus der Oxygenierung verschiedener Fettsäuren durch die benannten Enzyme ergibt sich schließlich eine Vielzahl von unterschiedlichen LM. Diese haben sich teils überschneidende bis völlig gegensätzliche Aktivitäten. Um komplexe biologische Prozesse gut verstehen oder pharmakologisch effizient modulieren zu können, bedarf es der Erstellung sehr umfangreicher LM-Profile [5, 14]. Makrophagen sind als Schlüsselspieler der angeborenen und erworbenen Immunabwehr integraler Bestandteil entzündlicher Prozesse und assoziierter Erkrankungen [1, 15]. Aufgrund ihrer ausgeprägten Plastizität sind sie außerdem in der Lage ein sehr breites Spektrum an LM zu synthetisieren [16]. Der Kern dieser Arbeit war die Entwicklung und Erprobung eines Makrophagen basierten Testsystems zur Charakterisierung umfassender LM-Profile in Abhängigkeit verschiedener modulierender Faktoren wie pharmakologisch aktive Substanzen oder die Kommunikation mit unterschiedlichen Nachbarzellen.

Durch in-vitro Differenzierung von Monozyten aus Blutspenden und anschließender Polarisierung wurden zwei klassische Makrophagenphänotypen gewonnen: einen früh im Entzündungsgeschehen auftretenden proinflammatorischen/antimikrobiellen M1-Typ sowie einen später vorkommenden entzündungsauflösenden und wundheilungsfördernden M2-Typ



[17-19]. Im Vergleich zu anderen Stimuli stellten sich vor allem pathogene Varianten von *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) als ausgezeichnete Aktivatoren der LM-Biosynthese heraus. Entsprechend ihrer enzymatischen Ausstattung zeigten M1 (COX-2 $\uparrow$ ) ein eher proinflammatorisches, Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>)- und Leukotrien B4 (LTB<sub>4</sub>)-reiches LM-Profil; M2 (15-LO-1 $\uparrow$ ) dagegen ein eher SPM-geprägtes antiinflammatorisches Spektrum. Während nahezu alle verwendeten Stimuli gute Initiatoren der COX-Produktbildung gewesen sind, war die subzelluläre Translokation und Enzymaktivität der 5-LO und 15-LO-1 an einen anhaltenden Calciumeinstrom durch die stärker virulenten Bakterien geknüpft. Mit den Arbeiten in Manuskript 1 identifizierten wir erstmals Stimuli, die in der Lage waren, alle Hauptbiosyntheseenzyme der LM-Bildung (COX, 5-LO, 15-LO-1) in isolierten Zellen zu aktivieren.

Inhibitoren der LM-Biosynthese kranken oft an vorwiegend symptomatischer, nicht aber kausaler, die Entzündung final auflösender, Wirkweise. Als Ursache wird unter anderem diskutiert, dass pro- und antiinflammatorische Mediatoren sich teilweise dieselben Syntheseenzyme teilen. Beispielsweise katalysiert die 5-LO sowohl die LTB<sub>4</sub>-Bildung, zusammen mit der 15-LO aber auch die Produktion zahlreicher SPM [5, 20, 21]. Des Weiteren gilt die sogenannte Substratumleitung (Shunting) infolge der Blockade eines proinflammatorischen Enzymes hin zu einem anderen als mögliche Ursache unerwünschter Nebenwirkungen [21-23]. Für Manuskript II etablierten wir eine Methode zur umfassenden und zeitlich sehr effizienten LM-Analytik. Dafür kombinierten wir literaturbekannte Tandem-Massenspektrometrie-Methodik (MS/MS) mit vorgeschalteter Ultra Performance Liquid Chromatography-Technologie (UPLC). In Anbetracht oben aufgezählter Probleme von Inhibitoren der LM-Biosynthese sollte ein neues Testsystem (*E. coli*; M1/M2; UPLC-MS/MS) genutzt werden, um bekannte pharmakologische Substanzen hinsichtlich ihres Einflusses auf ein gesamtheitlicheres LM-Profil (mit 33 verschiedenen Spezies) genauer unter die Lupe zu nehmen. Neben der erwarteten Inhibition des postulierten Zielenzymes zeigten die untersuchten Substanzen teilweise erstaunliche Effekte auf das gesamte LM-Netzwerk: (I) Die Inhibitoren der COX und 15-LO-1 erhöhten gleichzeitig die Konzentration proinflammatorischer Leukotriene. (II) Die Leukotrienhemmung der Inhibitoren der 5-LO und dessen Helferprotein FLAP (5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein) war in M1 stärker ausgeprägt als in M2. (III) Während der klinisch zugelassene 5-LO-Inhibitor Zileuton auch die Bildung von 15-LO-Produkten, inklusive SPM blockierte, mündete der FLAP-Inhibitor zusätzlich in erhöhten, vor allem DHA-abgeleiteten, SPM. (IV) Der 15-LO-1 Inhibitor 3887 blockierte die Produktbildung sämtlicher SPM in M2. Die Ergebnisse aus Manuskript II zeigen, dass vermeintlich spezifische Modulatoren von Enzymen der LM-Biosynthese das Gesamtnetzwerk unerwartet stark verändern können. Potenziell kann also durch die Einnahme bestimmter Substanzen neben der erwünschten Dämpfung entzündlicher Prozesse auch deren Auflösung ausgebremst

werden. Zukünftig könnten Inhibitoren von FLAP oder anderen nachgeschalteten Enzymen von COX und LO sowie duale Inhibitoren vielversprechendere Wirkstoffkandidaten, mit günstigeren LM-Profilen, darstellen.

Im Rahmen des Manuskriptes III nutzen wir die gewonnene Expertise aus den vorangegangenen Arbeiten und etablierten ein Makrophagen basiertes Kokulturmodell mit unterschiedlichen (entarteten und nicht-entarteten) Zellpartnern, um deren gegenseitigen Einfluss auf die LM-Biosynthesekapazität genauer zu untersuchen. Dabei konnten wir zeigen, dass die zellkontaktlose Kommunikation von epithelialen Krebszellen (A549, HT-29) mit Tumor-assoziierten/M2-ähnlichen-Makrophagen (TAM/M2) zu einer potenziell krebsfördernden Tumormikroumgebung, die reich an Leukotrienen und Prostaglandinen ist, beitragen kann. Für die Kokultur von TAM/M2 und A549-Lungenkrebszellen untersuchten wir die mechanistischen Hintergründe genauer. Eine vorherige Kokultur über 48 Stunden erhöhte die Leukotrienbildungskapazität der Makrophagen stark. Diese Immunzellen reagierten auf die (bakteriell-induzierte) LM-Stimulation wesentlich sensitiver als die monokultivierten Kontrollen. Das Phosphorylierungs-Ausmaß von p38 MAPK (p38-Mitogen-aktivierte Protein Kinase) und der nachgeschalteten Kinase MAPKAPK-2 (MAPK-aktivierte Proteinkinase 2), welche die 5-LO phosphoryliert und deren Produktbildung fördert [24, 25], war während der Stimulation stark erhöht. Dementsprechend verhinderte der p38 MAPK-Inhibitor Skepinone-L selektiv die beschriebene erhöhte 5-LO-Produktbildung. Außerdem steigerten die Makrophagen die Prostaglandinbildungskapazität der epithelialen Krebszellen. Als sehr wahrscheinliche Ursache konnte eine, aus Kokultur resultierende, verstärkte COX-2-Expression in A549 experimentell bestimmt werden.

Zusammenfassend identifizierten wir erstmals Stimuli, die alle Hauptbiosynthesenzyme der LM-Bildung (COX, 5-LO, 15-LO) in isolierten Zellen aktivieren können und dabei sowohl calcium- als auch phosphorylierungs-abhängige Enzymaktivierungen involvieren. In Kombination mit verschiedenen Makrophagenphänotypen und einer selektiven und sensitiven UPLC-MS/MS basierten Analytik war es möglich, umfangreiche LM-Profile zu erstellen. Dieses Testsystem erlaubte uns sehr genau nachzuvollziehen, wie pharmakologisch aktive Substanzen oder andere zelluläre Interaktionspartner den LM-Fingerabdruck modulieren. Damit hilft die vorliegende Arbeit bei der Identifizierung von potenziell nebenwirkungsärmeren und effizienteren entzündungsauflösenden Wirkstoffen. Außerdem kann das etablierte Testsystem dazu beitragen entzündungsassoziierte Erkrankungen, darunter auch Krebs, mit veränderter LM-Biosynthese mechanistisch besser verstehen und therapieren zu können.

## SUMMARY

A multitude of widespread diseases, including vascular and neurological disorders, adipositas, type-2 diabetes, asthma and cancer have an inflammatory component. Unfortunately, the success in curing those diseases is still quite limited. Thus, there is a high need in searching for better therapeutic strategies [1-3]. Manipulating the levels of different arachidonic acid (AA)-, eicosapentaenoic acid (EPA)- and docosahexaenoic acid (DHA)-derived pro- and anti-inflammatory lipid mediators (LM) may serve as a promising strategy. The biosynthesis of these LM is orchestrated by the action of different phospholipases (PLA<sub>2</sub>), cyclooxygenases (COX), lipoxygenases (LO) or/and CYP-enzymes, as well as additional downstream enzymes. A dysregulation of these LM is associated with many diseases mentioned above [4-7]. Somewhat simplified the following properties can be assigned to the three major LM families: (I) The 5-LO-derived Leukotrienes act predominantly proinflammatory. (II) SPM (specialized pro-resolving mediators; mainly biosynthesized by 15-LO) are anti-inflammatory mediators. And (III) COX-derived prostaglandins have different immunomodulating (pro- and anti-inflammatory) biological properties [2, 5, 6, 8]. Owing to the knowledge that tumour-associated-inflammation is an enabling characteristic of several kind of cancers, it is reasonable that leukotrienes predominantly act in a pro-tumoral manner, while SPM have opposite effects. For prostaglandins it is a little more complicated; especially because of many immunosuppressive, tumour-elimination disturbing properties, they mainly act in a pro-tumoral fashion [8-13]

The oxygenation of fatty acids by the enzymes mentioned above results in many different LM. The biosynthesized LM are having partially redundant till completely opposite biological activities. For a proper understanding or an efficient pharmacological manipulation of complex biological processes, it is necessary to determine very comprehensive LM profiles [5, 14]. Macrophages are key players of the innate and adaptive immune system and are involved in actually all kind of inflammatory processes and associated diseases [1, 15]. Furthermore, according to their high plasticity, these cells can produce a broad spectrum of LM [16]. The main aim of this thesis was the development of a macrophage-based test system yielding to very comprehensive LM profiles, as well as the investigation how these LM fingerprints are modulated by small molecules or the humoral communication with other cells.

We created two classical subtypes of macrophages (M1 and M2) by isolating monocytes from human blood, followed by in-vitro differentiation and polarization. The M1-type normally occurs early in inflammatory processes and acts in a proinflammatory/antimicrobial fashion. The M2-type appears later and has inflammation-resolving and wound-healing properties [17-19]. By comparing various stimuli, we observed that more virulent variants of the bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) are excellent activators of LM biosynthesis. According to their different enzyme expression, M1 (COX-2 $\uparrow$ ) produced a more

proinflammatory, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)- and leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)-enriched profile; while the stimulation of M2 (15-LO-1<sup>↑</sup>) resulted in a more anti-inflammatory spectrum with higher levels of SPM. Intriguingly, all the stimuli we tested were able to initiate the formation of COX products. By contrast the subcellular trans-location and enzyme activity of 5-LO and 15-LO-1 were strongly coupled to a sustained cellular calcium influx (by more virulent bacteria). In manuscript I, for the first time we identified stimuli activating all main LM-biosynthesizing enzymes (COX, 5-LO, 15-LO-1) in isolated cells.

Inhibitors of LM biosynthesis often block inflammation only in a symptomatic (pain, swelling), but not causative manner. They are not able to resolve inflammation properly. One reasonable explanation is that pro- and anti-inflammatory LM are partially synthesized by the same enzymes. For instance, 5-LO catalyses the production of LTB<sub>4</sub>, but also enables the formation of many SPM together with 15-LO [5, 20, 21]. Furthermore, blocking one proinflammatory enzyme can lead to a shunting of fatty acid substrates to another one, possibly resulting in undesirable side effects [21-23]. For manuscript II we established a system allowing comprehensive and less time-consuming LM analytics by having combined a literature-known tandem mass spectrometry method (MS/MS) with an Ultra Performance Liquid Chromatography technology (UPLC). Regarding the above-mentioned problems of LM biosynthesis inhibitors we aimed to use this new test system (*E. coli*; M1/M2; UPLC-MS/MS) to re-evaluate well-known pharmacological substances by comprehensively characterizing associated LM profiles (including 33 different species). Besides expected on-target actions, we obtained additional valuable information: (I) Inhibitors of COX and 15-LO-1 elevated proinflammatory leukotrienes. (II) The efficiency in decreasing leukotrienes of the inhibitors targeting 5-LO or its helper protein FLAP (5-lipoxygenase-activating protein) was more pronounced in M1 than in M2. (III) While the clinical approved 5-LO inhibitor Zileuton also blocked the product formation of 15-LO-1, including SPM, inhibition of FLAP increased several, especially DHA-derived SPM. (IV) The 15-LO-1 inhibitor 3887 suppressed the formation of all SPM in M2. The results of manuscript II show that supposedly specific modulators of LM-biosynthesizing enzymes can change the entire LM network in an unexpected manner. In this way it is possible that some drugs not only dampen inflammation but also slow down the resolution of inflammation. For the future, targeting FLAP or other downstream enzymes of the COX and LO pathways, as well as using dual inhibitors, leading to more favourable LM profiles, may serve as more promising strategies to treat inflammatory disorders.

For manuscript III we used our new technical expertise and established a macrophage-based coculture model with different cancerous and non-cancerous cell lines to study how their mutual interaction influences their LM-biosynthetic capacities. We could show that already humoral communication of epithelial cancer cells (A549, HT-29) and tumour-associated/M2-

like macrophages (TAM/M2) can create a leukotriene- and prostaglandin-enriched, potentially cancer-promoting, tumour-microenvironment. For the coculture of TAM/M2 and A549 lung cancer cells we studied the mechanistic background in more detail. 48 hours coculture strongly elevated the leukotriene formation capacity in macrophages. Compared to their monocultures, the formerly cocultured immune cells responded much more sensitive to bacterial induced stimulation of LM biosynthesis. Both the phosphorylation of p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) and their downstream kinase MAPKAPK-2 (MAPK-activated protein kinase 2), which is known to phosphorylate and stimulate 5-LO activity [24, 25], were strongly increased during stimulation. Accordingly, this increase of 5-LO products was selectively prevented in the presence of the p38 MAPK inhibitor Skepinone-L. Furthermore, the precedent coculture with macrophages led to an elevated prostaglandin formation capacity of A549 cancer cells. This was accompanied by increased levels of COX-2 enzyme expression compared to A549 monocultures.

Conclusively, for the first time we identified stimuli activating all relevant LM-biosynthesizing pathways (COX, 5-LO, 15-LO) in isolated cells, involving both calcium- and phosphorylation-dependent enzyme regulations. In combination with different macrophage phenotypes and a UPLC-MS/MS based analytical method of high selectivity and sensitivity we were able to determine comprehensive LM profiles. This test system allowed us to check exactly, how pharmacological active compounds or cellular interaction partners modulate the LM fingerprint. Thus, this thesis can help to identify potentially safer and more efficient inflammation-resolving drugs. Additionally, the established test system can contribute to better mechanistically understand and to treat inflammatory disorders (like cancer) that are associated with dysregulated LM biosynthesis.

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Immunologische Grundlagen

#### 1.1.1 Entzündung im Rahmen der angeborenen und erworbenen Immunantwort

Die Kardinalsymptome der Entzündung wurden bereits vor etwa 2000 Jahren von Aulus Cornelius Celsus mit Rötung, Wärme, Schmerz, Schwellung und von Galenos von Pergamon, der die gestörte Funktion eines Gewebes (*functio laesa*) hinzufügte, aufs Trefflichste beschrieben [26]. Ende des 19. Jahrhunderts ergänzten zwei wichtige Lehren das Verständnis der Entzündung. Zum einen die Theorie der Immunität durch zelluläre Komponenten von Elias Metschnikoff, dem Entdecker der Phagozytose. Zum anderen die Theorie der humoralen Immunität von Paul Ehrlich, der neben Emil von Behring Mitentwickler erster Antiseren gegen Diphtherie und Tetanus war [27].

Wir wissen heute, dass die (Patho-)Physiologie einer Entzündung äußerst komplex ist. Ein Modell des renommierten Immunologen Ruslan Medzhitov erleichtert das Verständnis. Er teilt die Entzündung in die Module: Auslöser, Sensoren, Mediatoren und Effektoren/Zielgewebe ein [1, 27]. Die Auslöser können von exogener (beispielsweise Bakterien, Viren, Allergene) oder endogener (Stress- oder Gewebsschädigung-assoziierte Strukturen) Natur sein. Die Sensoren, die solche Pathogen- beziehungsweise Schaden-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs/ DAMPs, pathogen-/damage-associated molecular patterns) erkennen, sind vor allem Makrophagen, dendritische Zellen und Mastzellen, welche ihrerseits mit korrespondierenden Erkennungsrezeptoren (PRRs, pattern recognition receptors) ausgestattet sind [1, 26, 27]. Je nach Auslöser und Sensor werden die unterschiedlichsten Mediatoren (darunter Zytokine, vasoaktive Amine, Lipidmediatoren) freigesetzt. Allgemein hin erleichtern diese Mediatoren durch Lockstoffe, Vasodilatation und Erhöhung der Gefäßpermeabilität den Eintritt weiterer immunkompetenter Zellen in das Zielgewebe. Darüber hinaus können entsprechende Zytokine systemisch wirken. Beispielsweise initiieren sie Fieber, Müdigkeit und erhöhte Schmerzsensibilität durch zerebrale Aktivität oder verursachen in der Leber die verstärkte Produktion Akuter-Phase-Proteine, wie C-reaktives Protein (CRP) oder Komplementfaktoren. Die stark angereicherten Zellen (vor allem Neutrophile Granulozyten und Makrophagen), unterstützt und moduliert von humoralen Komponenten (darunter Antikörper und Komplementsystem), versuchen die Auslöser der Entzündung im Zielgewebe auf unterschiedlichste Art und Weise zu eliminieren [1, 26-28].

Diese vergleichsweise unspezifische Immunantwort des sogenannten Angeborenen Immunsystems wird dabei durch die Maschinerie des Erworbenen Immunsystems ergänzt. Für letzteres basieren Immunreaktionen auf sehr variabler Antigenerkennung und laufen bei Erstkontakt verhältnismäßig langsam, bei Reexposition durch langanhaltenden Schutz sehr

rapide ab [29]. Aufs Kürzeste heruntergebrochen (I) erkennen Dendritische Zellen und Makrophagen (als Sensoren) pathologische Strukturen, (II) phagozytieren diese, (III) prozessieren diese zu kleineren Peptidstrukturen und (IV) präsentieren diese in den sogenannten MHC (major histocompatibility complex)-Proteinen naiven T-Zellen (Erkennung über ihren fremd-erkennenden T-Zell Rezeptor). (VI) T-Zellen entsprechender Antigenkorrespondenz reifen und vermehren sich. (VII) Auf diese Art werden selbst zytotoxisch agierende T-Zellen (CTL, cytotoxic T lymphocytes) oder T-Helfer-Zellen, die wiederum die Zytotoxizität anderer Immunzellen (TH1) oder eine spezifischere Antikörperbildung von B-Zellen (TH2) stimulieren, klonal vermehrt. Daneben können B-Zellen durch Antigenerkennung auch ohne T-Zell-Beteiligung vergleichsweise unspezifische Antikörper bilden [28, 29]. Zusätzlich spielen bei der T-Zell-Aktivierung neben der T-Zell-Rezeptor-MHC-Interaktion kostimulatorische und koinhibitorische Rezeptoren auf Seiten der T-Zellen und der Antigen-präsentierenden Zellen (APC, antigen-presenting cells) eine wesentliche Rolle. Beispielsweise drosseln die klinisch relevanten koinhibitorischen T-Zell-Rezeptoren CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) und PD-1 (programmed cell death protein 1) die immunologische Aktivität der T-Zellen [29, 30]. Zusammen mit den APC komplettieren die T- und B-Zellen (als weitere Effektoren) so die gesamtheitliche Immunantwort.

### **1.1.2 Das „Löschen der Flamme“ – Entzündungsauflösung**

Nicht abklingende Entzündungen werden als chronisch bezeichnet. Viele Erkrankungen, darunter Adipositas, Typ-2 Diabetes, Asthma, neurodegenerative Krankheiten und Krebs sind durch eine chronische Entzündung charakterisiert [1, 2, 27]. Als Ursache werden anhaltende immunologische Adaptionsversuche auf Fehlfunktionen verschiedener Gewebe, bedingt durch Mutationen oder pathologische Umweltfaktoren (hochkalorische Ernährung, Bewegungsarmut, toxische Substanzen, Alter, persistierende Infektionen), diskutiert [1, 27].

Normalerweise klingen akute Entzündungen nach gewisser Zeit wieder ab. Diese sogenannte Entzündungsauflösung (Resolution) ist kein passives Ereignis, sondern ein aktiver, koordinierter Prozess mit dem Versuch der Wiederherstellung der ursprünglichen Gewebefunktion [2, 7, 26, 31, 32]. Bei klassisch-infektionsbedingten Entzündungen kann die Resolution zeitlich als Periode zwischen dem frühen Maximum infiltrierter Immunzellen (insbesondere PMNL, polymorphonuclear leukocytes = Granulozyten) und dem darauf folgenden Minimum eingeordnet werden [31]. Als Kernprozesse der Entzündungsauflösung gelten dabei: (I) die Beseitigung der inflammatorischen Stimuli (beispielsweise infolge von Phagozytose und Zerstörung durch PMNL); (II) das Abfangen beziehungsweise der Abbau proinflammatorischer Mediatoren; (III) die Apoptose von PMNL, gefolgt von ihrer Beseitigung durch Makrophagen (Efferozytose) und deren Wechsel zu einem antientzündlichen,

geweberegenerierenden (M2-like) Phänotyp; (IV) sowie die Einwanderung von Monozyten und Differenzierung zu weiteren regulatorisch wirkenden Makrophagen [31, 32].

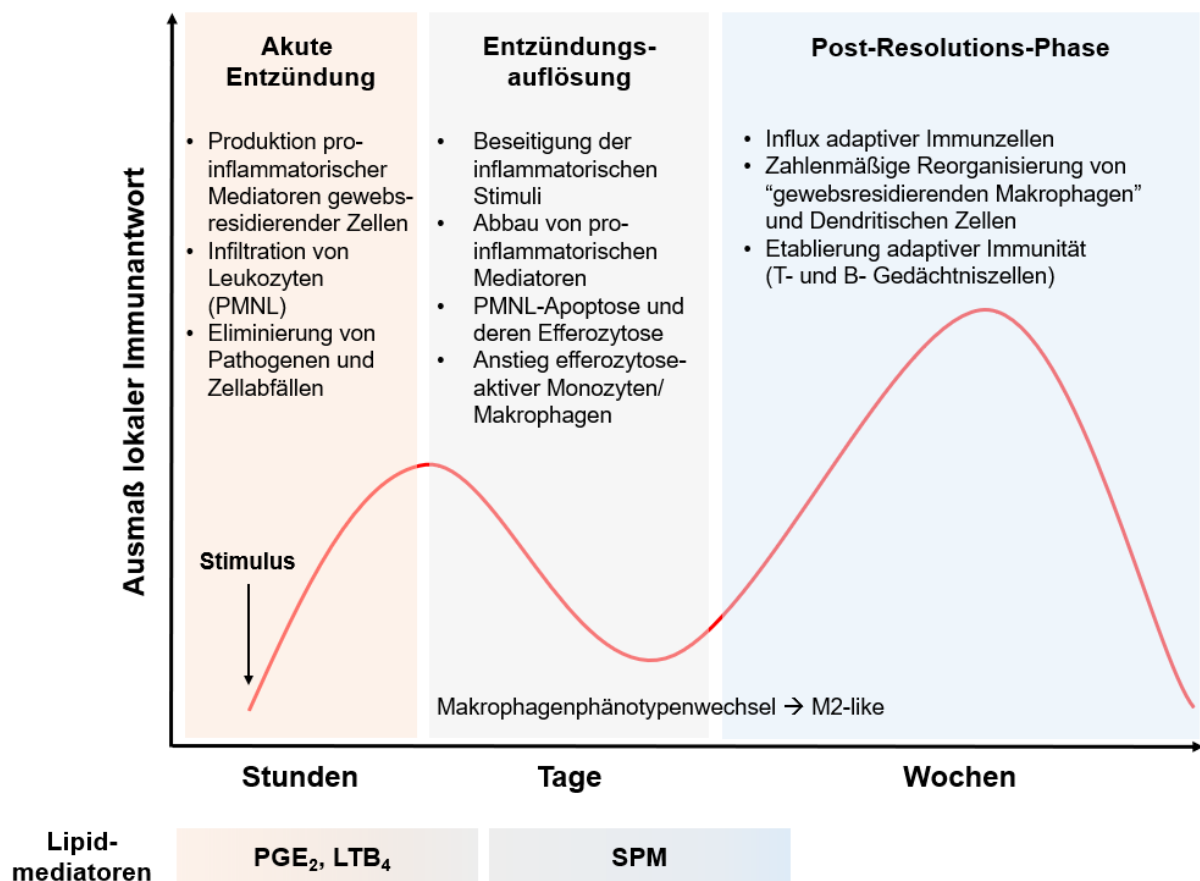
Zwei hochrangig publizierte Studien illustrierten den Verlauf von Entzündung und deren Auflösung besonders gut. Beide initiierten eine intraperitoneale Entzündung (durch Bakterien oder Zymosan, einem Homoglykan aus der Zellwand von Hefen) und charakterisierten mittels Durchflusszytometrie die zeitabhängige Präsenz unterschiedlicher Immunzellen. In beiden Arbeiten ergab sich ein entzündungsbedingtes PMNL-Maximum innerhalb von etwa 4 bis 12 Stunden, gefolgt von der Entzündungsauflösung mit einer auf ein Minimum sinkenden PMNL-Zahl bei gleichzeitigem Ansteigen der efferozytoseaktiven Monozyten/Makrophagen-Population über etwa 2 bis 3 Tage. Die Infektion mit unphysiologisch hohen Konzentrationen an Bakterien oder Zymosan verhinderten in beiden Studien die Auflösung der Entzündung, repräsentiert durch ein ausbleibendes Absinken der PMNL-Zahl innerhalb der ersten Tage [33, 34]. Eine der beiden Arbeiten setzte die Überwachung der (mit Zymosan) infizierten Mäuse über Wochen fort und kam zu weiteren hochinteressanten Ergebnissen. Ab Tag 6 etwa startete eine weitere Welle einströmender Leukozyten. Die Zahl, der aus Monozyten differenzierten Makrophagen und Dendritischen Zellen, myeloiden Suppressorzellen (MDSC, myeloid-derived suppressor cells) sowie der gewebsresidierenden Makrophagen stieg über mehrere Tage an und persistierte über Wochen. Experimentell wiesen die Autoren nach, dass diese Zellen an der Rekrutierung, Aktivierung und Regulierung von Zellen des adaptiven Immunsystems mitbeteiligt sind. Außerdem durchliefen die Makrophagen eine Phänotypenänderung, welche noch 60 Tage nach Zymosan-Applikation bestand und die immunologische Antwort auf eine erneute Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* signifikant drosselte [33]. Die Autoren resümierten drei Phasen für sich wieder auflösende Entzündungen: (I) eine (stundenlange) Akute Entzündung; (II) eine (tagelange) Entzündungsauflösung; (III) eine (wochenlang) persistierende Post-Resolutions-Phase. Außerdem diskutierten sie, dass die Entzündungsauflösung eine Grundvoraussetzung für die Post-Resolution-Phase darstellt und die Brücke vom angeborenen zum adaptiven Immunsystem schlägt sowie ein Ausbleiben womöglich in chronisch entzündlichen Erkrankungen münden kann [31, 33].

Auch die Entzündungsauflösung mit den oben benannten vier Kernprozessen wird von einer Vielzahl spezifischer Mediatoren und Effektoren getragen. Prominente Beispiele sind Pseudo-Chemokinrezeptoren wie DARC (Duffy antigen/receptor for chemokines) und D6, die Chemokine binden ohne entsprechende Signaltransduktionswege zu initiieren [32]. Des Weiteren ist Annexin A1 (und Glucocorticoide als dessen Expressionsinduktoren) zu nennen, welches die Apoptose von PMNL stimuliert, die Efferozytose katalysiert (indem es die Verbindung zwischen dem „Iss-mich-Signal“ Phosphatidylserin auf der Granulozytenoberfläche und korrespondierenden Makrophagenrezeptoren knüpft) oder die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>, cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>) und damit die Produktion



proinflammatorischer Lipidmediatoren (LM) hemmt [32, 35]. Weiterhin schütten PMNL infolge der Apoptose „Finde-mich-Signale“ wie Nukleotide, Sphingosin-1-Phosphat (S1P) oder Lysophosphatidylcholin (LPC) aus, um Phagozyten anzulocken. Lokale Mediatoren wie einige Vertreter der SPM (specialized pro-resolving mediators), aber auch der Efferozytoseprozess per se induzieren wiederum den Phänotypenwechsel der Makrophagen zu einem antientzündlichen, geweberegenerierenden (M2-like) Subtyp [19, 31, 32].

Der experimentelle Fokus dieser Arbeit liegt auf den aus verschiedenen Fettsäuren biosynthetisierten LM. Dazu zählen sowohl die vorwiegend proinflammatorischen Moleküle der akuten Entzündungsphase, wie beispielsweise vasodilatierendes Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und chemotaktisches Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), aber auch die zur Entzündungsauflösung beitragenden SPM [2, 31, 32]. Die LM werden im Kapitel 1.5.1 detaillierter vorgestellt.



**Abb. 1: Chronologie der Entzündung.** Adaptiert und modifiziert von Fullerton et al. 2016 und Serhan et al. 2014 [2, 31].

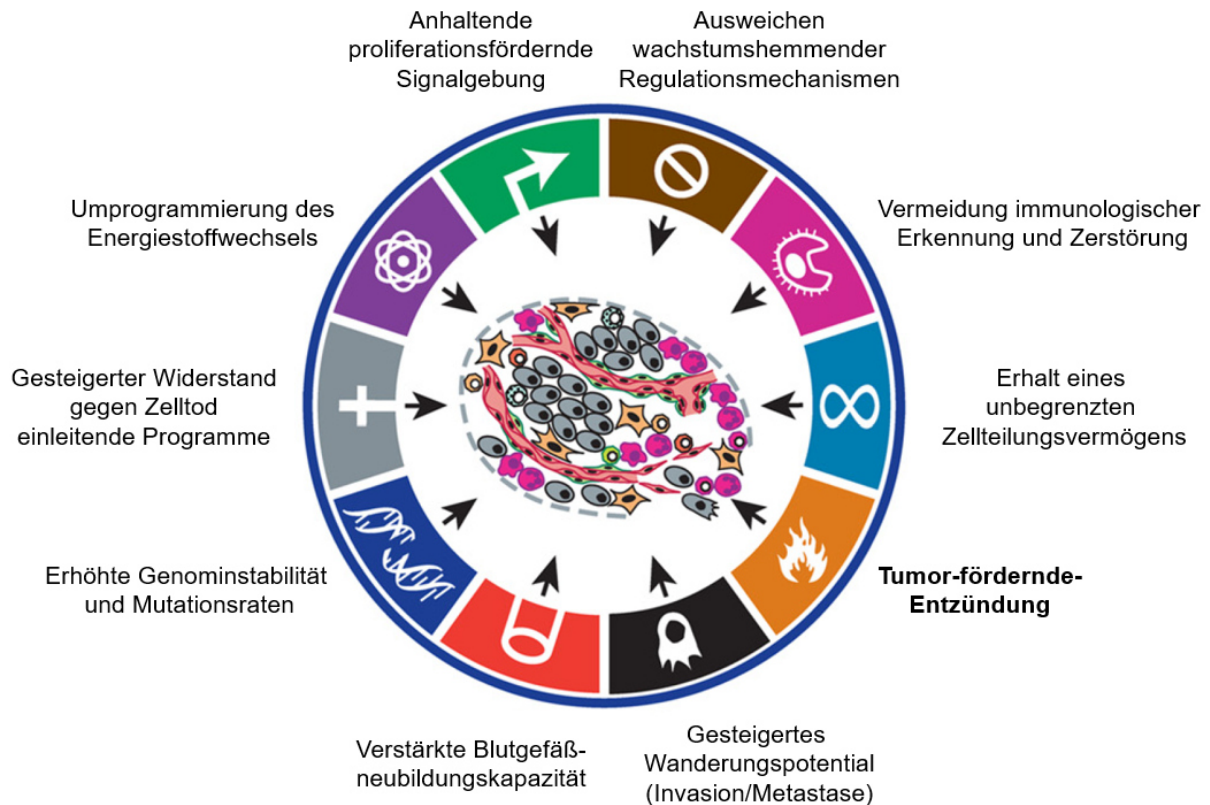
### **1.1.3 Immunantwort auf Tumorzellen – Immunoediting in drei Phasen**

Das Immunsystem ist in der Lage Krebszellen zu beseitigen (frühe Eliminierungsphase). Natürliche Killerzellen (NK Zellen) als Teil des Angeborenen Immunsystems und cytotoxische T-Zellen als Teil des Erworbenen Immunsystems sind hier die Schlüsselspieler [29, 36]. Oft erfolgt die „Fremderkennung“ für NK Zellen durch unspezifisches Erkennen des Fehlens körpereigener MHC-I Proteine; für zytotoxische T-Zellen durch spezifische Erkennung von Krebsantigenen (beispielsweise infolge Aminosäure-verändernder Mutationen) unter Beihilfe antigenpräsentierender Zellen. Im Kampf zwischen Immunsystem und entarteten Zellen bewirkt ein gewisser Selektionsdruck die Entstehung immer schwächer immunogener Varianten (lange Gleichgewichtsphase). Schlussendlich können Krebszellen durch Mechanismen wie beispielsweise Herunterregulierung oder Mutationen von MHC-I, Hochregulierung der Liganden PD-L1 (programmed cell death 1 ligand 1) oder PD-L2 (programmed cell death 1 ligand 2) und der Gegenwart weiterer immunsupprimierender Zellen (darunter Makrophagen und Myeloide Suppressorzellen) der Zerstörung durch das Immunsystem entkommen und klinisch erkennbar werden (Entkommensphase) [29, 36, 37]. Paradoxerweise liegt in vielen Fällen manifestierter Krebserkrankungen eine, insbesondere durch Zellen des Angeborenen Immunsystems getragene, Tumor-fördernde-Entzündung vor [9]. Diese wird im nachfolgenden Kapitel genauer beleuchtet.

## **1.2 Krebs und Tumor-fördernde-Entzündung**

Trotz intensivster Forschungsanstrengungen werden Krebserkrankungen als global häufigste Todesursache und wichtigstes Hindernis zur Erhöhung der Lebenserwartung im 21. Jahrhundert diskutiert [38]. In ihrer Pathogenese und Ausprägung sind maligne Erkrankungen sehr komplex und äußerst heterogen. Vor knapp 2 Jahrzehnten bemühten sich Douglas Hanahan und Robert A. Weinberg allgemeingültige Merkmale für Tumorerkrankungen zu definieren. Diese Kernmerkmale sind: (I) das anhaltende Einschalten zellulärer Signalwege, die für Wachstum und Teilung der Zelle zuständig sind; (II) das forcierte Ausweichen wachstumshemmender Regulationsmechanismen; (III) der erhöhte Widerstand gegen den Zelltod-einleitende Programme; (IV) den Erhalt einer, auf unbegrenzter Zellteilung basierten, Unsterblichkeit; (V) die verstärkte Blutgefäßneubildungskapazität; und (VI) ein gesteigertes Wanderungspotential der entarteten Zellen (Invasion und Metastasierung) [39]. Der Erkenntniszuwachs eines weiteren Jahrzehntes intensiver Krebsforschung machte es notwendig dieses Organisationsprinzip nochmals zu erweitern. Hinzugefügt wurden zum einem die sogenannten während der Krebspathogenese „Aufkommenden Merkmale“: (VII) die Umprogrammierung des Energiestoffwechsels; und (VIII) die Vermeidung der Zerstörung

durch das Immunsystem. Zum anderem die (den Krebs) “Ermöglichenden Merkmale”: (IX) erhöhte Genominstabilität und Mutationsraten; und (X) die Tumor-fördernde-Entzündung [9].



**Abb. 2: Charakteristische Merkmale von Tumorgeweben.** Adaptiert von Hanahan et al. 2011 [9].

Die altersabhängig steigende Inzidenz vieler Tumorerkrankungen ließ darauf schließen, dass mehrere Mutationen nötig sind, bis ein Gewebe bösartig wird. Ein auf dieser Tatsache gestütztes mathematisches Modell beschrieb, dass dabei zelltypenabhängig etwa vier bis sieben Mutationen nach der Geburt notwendig sind [40]. Aktuellere Ergebnisse konkretisieren diesen Sachverhalt. Dabei wird zwischen Mutationen, die Proliferations- und Überlebensvorteile kodieren („Driver“) und funktionell neutralen Mutationen („Passenger“) unterschieden. Ein auf evolutionsbiologischen Erkenntnissen und umfassenden Tumorgenomanalysen basierendes mathematisches Modell kalkuliert, dass gewebeabhängig etwa 1 bis 10 Driver-Mutationen für die Tumorphagenese erforderlich sind [41]. Aus Berechnungen einer relativ aktuellen Studie des Fachjournals Science für 32 Krebsarten ergeben sich krebserregende Mutationen durchschnittlich: zu 5% aus Vererbung, zu 29% aus Umweltfaktoren und zu 66% aus zufälligen Fehlern während der DNS-Vervielfältigung im Rahmen der Zellteilung. Da der Ausbruch einer Krebserkrankung meistens mehr als eine Mutation erfordert, schätzen die Autoren, dass dennoch etwa 40 % aller Krebserkrankungen durch einen gesunden Lebensstil vermeidbar wären [42].

Die Forschungsanstrengungen der vorliegenden Arbeit zielen vorwiegend auf das letzte oben benannte Merkmal, die Tumor-fördernde-Entzündung, ab. Bereits Rudolph Virchow stellte 1836 die Hypothese auf, dass Krebs seinen Ursprung an Stellen chronischer Entzündung hat [43]. Diese Entzündungen können dabei vielfältige Ursachen haben. Neben klassischen viralen und bakteriellen Infektionen können auch kanzerogene Faktoren wie Tabakrauch, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, UV-Strahlung, Alkohol sowie Diabetes- und Adipositas-assoziierte Hyperglykämie proinflammatorische Signalwege auslösen (darunter die Aktivierung von nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, NF- $\kappa$ B) [44]. Im Rahmen der Tumor-fördernden-Entzündung sind Immunzellen in der Mikroumgebung der entarteten Zellen von zentraler Bedeutung. Dazu gehören Makrophagen, dendritische Zellen, myeloide Suppressorzellen, Granulozyten, Mastzellen sowie T- und B-Lymphozyten [9, 15, 45]. Neben den bereits beschriebenen antitumoralen Funktionen können Immunzellen im Rahmen einer chronifizierten Entzündung ein hohes protumorales Potential über verschiedene Zytokine (darunter Chemokine und Wachstumsfaktoren), LM und Reaktive Sauerstoffspezies entfalten [15, 45-47]. Unglücklicherweise verläuft die Kommunikation zwischen Immunzellen und Krebszellen dabei oft in einer Art voranschreitenden Kreislauf. So führt beispielsweise die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Immunzellen zu vermehrter Zytokinproduktion. Diese bewirken wiederum eine verstärkte NF- $\kappa$ B-Signalgebung in den benachbarten Krebszellen. Folge ist unter anderem eine vermehrte Expression von Chemokinen, die weitere Immunzellen anlocken [45].

Da unter den Zellen des Immunsystems in der Tumormikroumgebung insbesondere die Makrophagen eine Schlüsselrolle einnehmen [15, 46, 47] und ein weiterer Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit sind, folgen detailliertere Erläuterungen im nachfolgenden Kapitel. Auch die Rolle von LM im Rahmen der Tumor-fördernden-Entzündung, ein weiterer Schwerpunkt experimenteller Anstrengungen dieser Arbeit, werden in Kapitel 1.5.2 ausführlicher vorgestellt.

## 1.3 Makrophagen

### 1.3.1 Makrophagen in der Immunantwort

Makrophagen haben ihren Ursprung entweder in den im Gewebe residierenden Vorläuferzellen, oder sie entstammen den im Blut zirkulierenden Monozyten, die infolge eines Stimulus in das Zielgewebe einwandern und ausdifferenzieren [15]. Sie stellen einen wahren Alleskönner des Immunsystems dar. Zum einen stehen Sie als Bestandteil des Angeborenen Immunsystems in der ersten Verteidigungslinie und erkennen, phagozytieren und beseitigen Schaden- und Pathogen-assoziierte Strukturen [15, 29]. Beispielsweise bilden sie cytotoxische reaktive Sauerstoffintermediate und Stickstoffmonoxid (NO) [47, 48]. Andererseits stellen sie die Schnittstelle zu anderen zeitlich verzögerten, dafür gezielteren Verteidigungsmechanismen dar. Nach Phagozytose von immunogenen Strukturen und Präsentation als aufgearbeitete Antigene an Lymphozyten leiten sie mit deren Aktivierung die Antwort des Erworbenen Immunsystems ein [15, 29, 45]. Makrophagen unterliegen hoher Plastizität. Während Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) oder bakterielle Bestandteile Makrophagen hin zu einem proinflammatorischen, antitumoralen Subtyp (M1-like) polarisieren, formen Zytokine wie Interleukin-4 (IL-4) oder IL-13 eher antientzündliche, geweberegenerierende und Tumorfördernde (M2-like) Makrophagen [15, 46, 47]. Entsprechend ihrer stärker proinflammatorischen Natur exprimieren M1-like-Makrophagen höhere Mengen an Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-12, IL23 und TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor-alpha) sowie an der Antigenpräsentation beteiligte Oberflächenmoleküle MHC-II und Kostimulatorproteine CD80 und CD86 (CD, cluster of differentiation) [15, 48, 49]. In-vitro-Untersuchungen der LM-Profile unter basalen Bedingungen und nach Stimulierung mit apoptotischen PMNL zeigten eine stärkere Biosynthese von entzündungsinizierenden LTB<sub>4</sub> und Prostaglandinen für M1-Makrophagen (M1) sowie eine erhöhte Produktion von entzündungsaflösenden SPM für M2-Makrophagen (M2) [16]. An dieser Stelle muss die hohe Plastizität der Makrophagen betont werden. Die M1/M2-Nomenklatur repräsentiert Extreme und simplifiziert die wahre Natur. Qualitative und quantitative Unterschiede der zellulären und azellulären Umgebung der Makrophagen formen diverse Phänotypen eines breiten Spektrums [15, 46, 50].

### 1.3.2 Tumor-assoziierte-Makrophagen

Tumor-assoziierte-Makrophagen (TAM) sind neben T-Zellen die meist gefundenen Immunzellen der Tumormikroumgebung [45, 47]. Ihr Rolle im Krebsgeschehen kommt metaphorisch betrachtet dem eines zweiseitigen Schwertes gleich.

Sie sind zum einen in der Lage antitumoral zu fungieren. Wie bereits beschrieben stimulieren sie beispielsweise nach Phagozytose und Antigenpräsentation an T-Zellen die Aktivität des Adaptiven Immunsystems gegen entartete Zellen [15, 46, 47]. Weiterhin können sie nach der Belegung von Krebszellen mit Antikörpern (Opsonierung) durch verstärkte Phagozytose oder Produktion extrazellulärer cytotoxischer Faktoren selbst krebshemmend agieren [46]. Eine interessante Studie kombiniert beide Ansätze. Eine Tripeltherapie aus: (I) einem Tumorantikörper (Opsonierung), (II) einen CD47 antagonisierenden Antikörper (CD47: Krebszellantigen, das dem Phagozyten „Friss mich nicht-Signale“ codiert), und (III) einem PD-L1 antagonisierenden Antikörper (PD-L1: signalisiert Immunzellen eine verminderte antitumorale Aktivität) zeigte im Mausmodell durch vermindertes Tumorstadium und gesteigerte Überlebensraten einen starken Synergismus. Die Autoren diskutierten eine erhöhte Antikörper-abhängige Phagozytose, verstärkte Antigenpräsentation und erhöhte antitumorale T-Zell-Aktivität [51]. Es ist bereits bekannt, dass die PD-L1 Bindung am PD-1-Rezeptor auf T-Zellen immunsuppressive Wirkungen entfaltet. Kürzlich wurde publiziert, dass sowohl in Mäusen als auch in Menschen die Zahl der PD-1 exprimierenden TAM mit voranschreitendem Krebsgeschehen wächst und dies weiterhin negativ mit deren (Tumor-) Phagozytosekapazität korreliert. Interessanterweise wiesen diese PD-1 positiven Zellen eher einen M2-like Phänotyp auf [52]. Womit wir zur anderen Schneide des Schwertes kommen.

Die oben beschriebene antitumorale Aktivität ist eher mit einem M1-like Phänotyp assoziiert [15, 46, 47]. Doch gemäß eines bereits benannten Krebsmerkmals, dem Entkommen der Zerstörung entarteter Zellen durch das Immunsystem, ändern Makrophagen im Laufe der Tumorstadium ihren Phänotyp häufig in Richtung M2-like [15, 52]. Neben IL-4 und IL-13 werden die unter anderem von Krebszellen produzierten Mediatoren wie IL-10, PGE<sub>2</sub>, TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) und M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) als mitbeteiligte Initiatoren der Phänotypenänderung diskutiert [47, 49]. Gewissermaßen simplifiziert weisen eine Vielzahl wissenschaftlicher Autoren den TAM eher einen M2-like Phänotyp zu [46, 47, 49]. Als wesentlicher Bestandteil der Tumor-fördernden-Entzündung fördern TAM viele andere bereits aufgezählte Merkmale maligner Krebserkrankungen. Es herrscht allgemeiner Konsens darüber, dass sie über verschiedenste Faktoren (nachfolgend in Klammern beispielhaft aufgezählt) die Proliferation und das Überleben entarteter Zellen (EGF, epidermal growth factor), die verstärkt anhaltende Angiogenese (VEGF, vascular endothelial growth factor), die Invasion und Metastase von Krebszellen (Matrix-

Metalloproteasen, Cathepsine) sowie die Immunsuppression mit verminderter antitumoraler Aktivität (IL-10, TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, PD-L1, PD-L2) fördern und damit maßgeblich zu Tumorprogression beitragen [9, 15, 43, 45-47, 49]. Insbesondere wenn die Tumormikroumgebung reich an M2-like Makrophagen ist, korreliert dies mit einer schlechten Prognose für den Krebspatienten [15]. Es ist wenig verwunderlich, dass TAM zunehmend in den Fokus aktueller Forschungsanstrengungen hinsichtlich Entwicklung und Anwendung neuer Strategien zur Bekämpfung maligner Erkrankungen rücken. Kurze Erläuterungen hierzu sind unter anderem Gegenstand des nachfolgenden Kapitels.

## **1.4 Therapeutische Ansätze in der Krebstherapie**

Die Krebstherapie umfasst die chirurgische Entfernung des malignen Gewebes, die Bestrahlung und die sogenannte Chemotherapie, allein oder in Kombination miteinander [53-55]. Die konventionelle Chemotherapie (konkrete Beispiele in Klammern) erlebte ihren Startschuss in den 1940er Jahren mit der Entdeckung erster alkylierender Agentien (Stickstoff-Lost), Antimetabolite der DNS-Synthese (Methotrexat) und zytotoxischer, sich zwischen Basenpaaren der DNS einlagernder, Antibiotika (Actinomycin A) [54]. Weitere Wirkstoffe und neue Zytostatikaklassen ergänzten in den folgenden Jahrzehnten die klassische Chemotherapie. Darunter zählen die Topoisomeraseinhibitoren, welche die Super- (Etoposid) oder Entspiralisierung (Camphotecin) der DNS stören [53] und pflanzliche Alkaloide (Vinblastin, Paclitaxel), die den physiologischen Umbau des Mikrotubuliapparates und damit die Mitose- und Zytoskelettfunktion beeinträchtigen [55]. Alle benannten Wirkmechanismen hemmen die Teilungsfähigkeit von Zellen auf verhältnismäßig unspezifische Art und Weise. Außer im malignen Zielgewebe entfalten klassische Zytostatika in Geweben mit hohen Zellteilungsraten (Knochenmark, Gastrointestinaltrakt, Haarfollikel) ihr toxisches Potential und verursachen damit typische Nebenwirkungen wie Schmerzen, Übelkeit, Diarrhoe, Kardiotoxizität, Haarverlust, Hautveränderungen und Immundepression [53].

Eine gezieltere Krebstherapie war erforderlich und wurde Ende der 1990er Jahre mit Vorstellung des ersten Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib eingeleitet [54]. Kleine Moleküle und monoklonale Antikörper, die Zielstrukturen adressieren, welche stärker mit dem entarteten Zelltyp assoziiert sind, wurden vermehrt entwickelt. Zu diesen vielversprechenden Wirkstoffzielen zählen unter anderem Wachstum- und Zellteilungs-regulierende Tyrosinkinasen (80% menschlicher Onkogene und Protoonkogene beeinflussen deren Proteinexpression), Serin/Threoninkinasen (darunter Kinasen des Ras/Raf/MAPKK/ERK-Signalweges, der in 90% der Melanome überaktiviert ist, mTOR, Zyklin-abhängige Kinasen) und Immuncheckpoint-Rezeptoren (insbesondere CTLA-4 und PD-1), dessen Ligandenbindung die antitumorale Aktivität kompetenter Immunzellen drosselt [53-55]. Die

Wirksamkeit korrespondierender Pharmazeutika – darunter der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib [56], der Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor Palbociclib [57], der BRAF-Inhibitor Vemurafenib [58], der CTLA-4-Antikörper Ipilimumab [59] und der PD-1-Antikörper Nivolumab [60] – konnte in klinischen Studien eindeutig belegt werden. Da auch diese gezielteren Therapieformen mitunter schwere Nebenwirkungen und Resistenzphänomene aufweisen [55], geht die Suche nach besseren oder ergänzenden Behandlungsstrategien weiter.

Ein äußerst innovativer Ansatz ist die CAR-T-Zell-Therapie (CAR steht für chimeric Antigen Receptor). T-Zellen können über ihren T-Zell-Rezeptor von Antigen-präsentierenden Zellen über ihren MHC-Peptid-Komplex und Beteiligung von Kostimulatorproteinen aktiviert werden, Zielzellen korrespondierender Antigenität (zum T-Zell-Rezeptor) zu erkennen und zu zerstören [61]. Im Rahmen dieser neuartigen Therapie werden patienteneigene T-Lymphozyten isoliert. Diese werden dann gentechnisch so verändert, dass sie ein chimäres Kunstprotein exprimieren, welches aus „Wunschantigen-bindender-Extrazellulardomäne“ und einer (dem T-Zell-Rezeptor- und Kostimulatorproteinen-ähnlichen) Intrazellulardomäne besteht. Dies ermöglicht den Zellen nach Reinjektion in den Patienten, „Wunschantigen-positive“ Krebszellen zu erkennen und zu zerstören [61, 62]. Die Therapie mehrerer die Blutbildung-betreffender Krebserkrankungen war klinisch von großem Erfolg gekrönt und mündete in mehreren behördlichen Zulassungen. Für die sogenannten soliden Tumore konnte ein vergleichbarer Behandlungserfolg noch nicht reproduziert werden. Eine schwer durchdringliche Extrazellularmatrix und eine immunsuppressive Tumormikroumgebung mit erhöhten Konzentrationen an Immuncheckpoint-Liganden (PD-L1, PD-L2), Tumor-assoziierten-Makrophagen (TAM) und PGE<sub>2</sub> werden als Ursache diskutiert [62].

Dies schlägt wiederum die Brücke zu einem Hauptforschungsschwerpunkt dieser Arbeit: Der Kommunikation von TAM und Krebszellen mit Fokus auf LM. Wie bereits ausführlicher diskutiert, ist die Rolle von TAM zweischneidig. Aber in der Mehrzahl der Forschungsuntersuchungen liegt ein Phänotyp vor, der quasi zu beinahe allen genannten Merkmalen maligner Erkrankungen beitragen kann [9, 15, 46, 47, 49]. Neue Therapieprinzipien, die auf die Rekrutierung und das Überleben von TAM (darunter Chemokine wie CCL2 und CCL5, die M-CSF-Ligand-Rezeptor-Achse und Makrophagen-selektive cytotoxische Agentien) oder deren Umpolarisierung zu einem antitumoralen M1-like Phänotyp abzielen, sind Gegenstand vieler aktueller präklinischer und klinischer Studien [15, 46, 47].

Auch die LM-gekoppelte Signalgebung in der Kommunikation zwischen Makrophagen und Krebszellen stellt einen sehr interessanten Angriffspunkt für pharmakologische Interventionen dar. Auf Basis eines systematischen Reviews zahlreicher Fall-Kontroll-, Kohorten- und randomisierter kontrollierter Studien konnte eine Reduktion des relativen Risikos für das Neuauftreten maligner Erkrankungen innerhalb von 15 Jahren für mehrere Krebsarten (Darm:



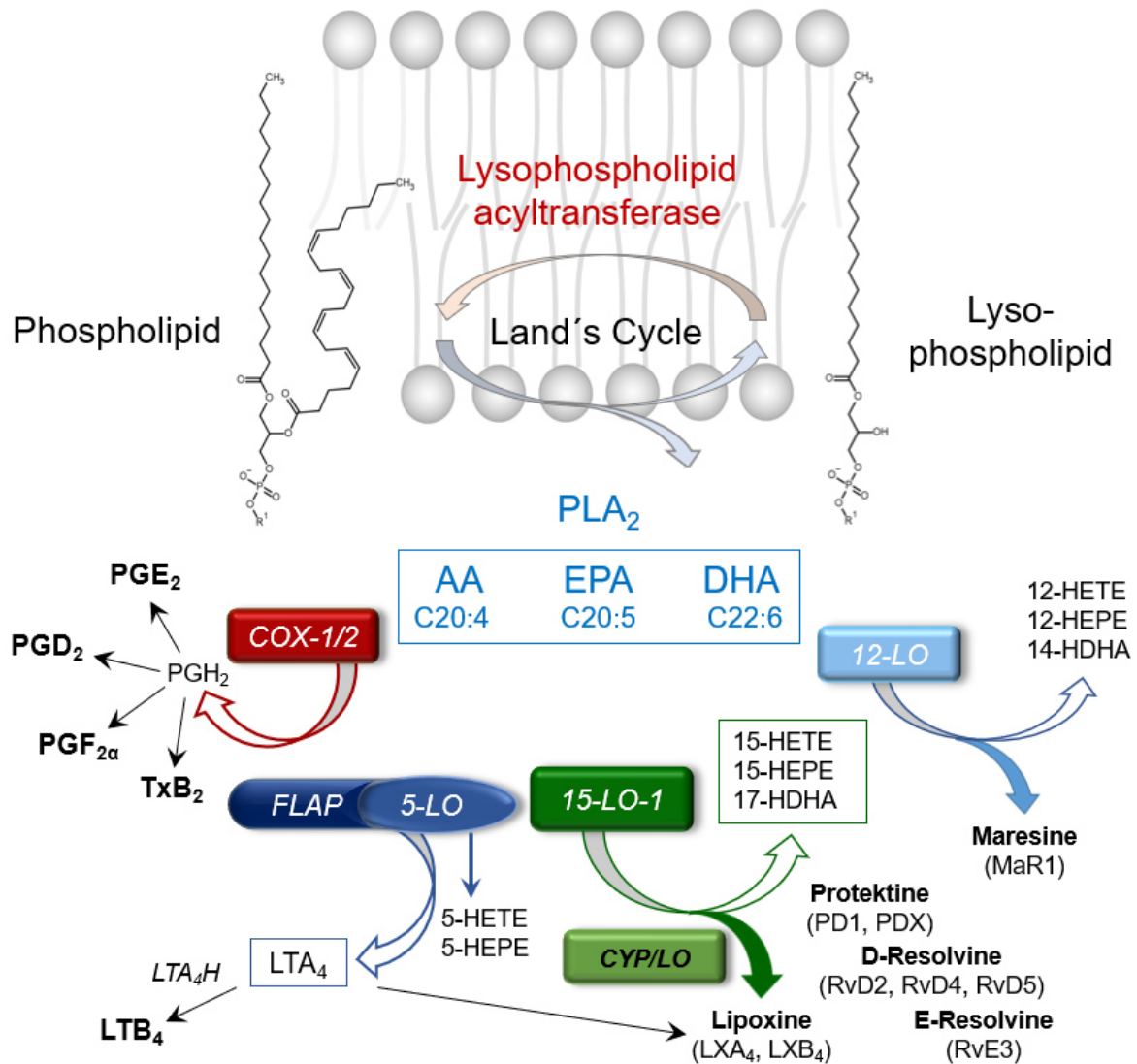
-35%, Speiseröhre und Magen: -30%, Brust und Prostata: -10%, Lunge: -5%) durch zehnjährige Einnahme des Prostaglandinsynthesehemmers Acetylsalicylsäure (ASS) berechnet werden [63]. Neben diesem enormen Potential für die Krebsprophylaxe gibt es aber auch eindeutige Hinweise auf einen Vorteil der ASS-Einnahme für die Therapie maligner Erkrankungen. Das Reevaluieren von fünf großen randomisierten kontrollierten klinischen Studien, die ursprünglich kardiovaskuläre Effekte adressierten, zeigte unter anderem, dass die tägliche ASS-Einnahme die Wahrscheinlichkeit von Metastasierungen drastisch senkt (etwa -30% für alle Krebsarten und -50% für Adenokarzinome) [64]. Die Annahme, dass die ASS-Wirkung für die Krebsprophylaxe (gemäß 24-Stunden-Dosierungsintervall) anhaltend sein muss, die Plasmahalbwertszeit jedoch nur etwa 20 min beträgt sowie für den gewünschten Effekt keine klassische Dosis-Wirkungs-Beziehung beobachtet wurde (ASS-Niedrigdosen bereits gut wirksam) – deutet mechanistisch auf eine irreversible Acetylierung der COX-1 in Thrombozyten hin [65]. Ein exakter Mechanismus, wie Thrombozyten die Krebspathogenese fördern können, bleibt bisher ungeklärt. Weiterhin scheint diese Risikoreduktion des Auftretens einiger Krebsarten nicht ASS-exklusiv zu sein. So zeigte beispielsweise eine große Kohortenstudie, dass häufige Verschreibungen von „Nicht-ASS-NSAR“ (NSAR, Nichtsteroidales Antirheumatikum) ebenfalls die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einiger Krebserkrankungen (Darm, Magen, Eierstöcke) deutlich senken konnte [66]. Über die, durch NSAR adressierten, Prostaglandine hinaus steckt auch großes therapeutisches Potential in der Modulation anderer LM. Als Hauptschwerpunkt dieser Arbeit werden diese Mediatoren bezüglich ihrer Biosynthese, Aktivität und Wirkstoffrelevanz nachfolgend genauer vorgestellt.

## 1.5 Lipidmediatoren

### 1.5.1 Lipidmediatoren – Biosynthese, Aktivität und Wirkstoffrelevanz

Prostaglandine, Leukotriene, SPM, Plättchenaktivierender Faktor (PAF), Lysophosphatidsäuren, Endocannabinoide und andere von Lipiden abgeleitete Botenstoffe werden in kollektiver Weise als Lipidmediatoren (LM) bezeichnet. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr, der Erhaltung der Gewebshomöostase, fungieren als Regulatoren im reproduktiven, gastrointestinalen sowie kardiovaskulären System und beeinflussen die Proliferation und Differenzierung von Zellen [4]. Der Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit lag auf LM, die aus den mehrfach ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure (AA; 20 C-Atome;  $\omega$ -6), Eicosapentaensäure (EPA, 20 C-Atome;  $\omega$ -3) und Docosahexaensäure (DHA, 22 C-Atome;  $\omega$ -3) biosynthetisiert wurden. Dazu zählen die vorwiegend proinflammatorischen Prostaglandine und Leukotriene aus der AA und die entzündungsaufLösungsfördernden SPM aus AA (Lipoxine), EPA (Resolvine der E-Serie) und DHA (Resolvine der D-Serie, Maresine und Protektine). Zusammen stellen sie pharmakologisch hochinteressante Schlüsselmediatoren akuter und chronisch entzündlicher Erkrankungen (darunter Asthma, rheumatoide Arthritis, Atherosklerose und Krebs) dar [5-7]. Wenn im Folgenden vereinfacht von LM gesprochen wird, handelt es sich um verschiedenste aus AA-, EPA- oder DHA-abgeleitete Mediatoren.

Fettsäuren unterliegen einem ständigen Ein- und Ausbau in/aus Phospholipiden der Biomembranen durch korrespondierende Acyltransferasen/Phospholipasen (Land's cycle) [4]. Infolge homöostatischer Regulation oder immunologischer Vorgänge werden die entsprechenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA, polyunsaturated fatty acids) durch Phospholipasen (PLA<sub>2</sub>) mehr oder weniger stark freigesetzt und können zu LM umgesetzt werden. Durch Einbau von zwei Sauerstoffmolekülen durch Cyclooxygenasen (COX-1, COX-2), eines Sauerstoffmoleküls durch Lipxygenasen (5-LO, 12(S)-LO, 12(R)-LO, 15-LO-1 und 15-LO-2), oder eines Sauerstoffatoms durch Cytochrom P450 Enzyme (CYPs) sowie nichtenzymatischer radikalischer Reaktionen entstehen oxygenierte Produkte wie Hydroperoxide, Epoxide oder Hydroxide. In der Regel bedarf es weiterer nachgeschalteter Enzyme wie Hydrolasen oder Isomerasen zur Entstehung der für uns hochinteressanten LM aus ihren Vorstufen. Im Falle einiger SPM ist die sequenzielle Aktivität zweier Lipxygenasen (LO); oder die Zusammenarbeit einer LO mit einer durch Acetylsalicylsäure-modifizierten COX oder einem CYP-Enzym für die Biosynthese nötig [4-6]. Die Vielfalt der unterschiedlichen LM ergibt sich aus der sehr dynamischen Expression und Regulierung sowie der unterschiedlichen räumlichen Verteilung (intrazellulär, transzellulär) mehrerer am Lipidmetabolismus beteiligter Enzyme in Abhängigkeit verschiedener Faktoren wie Zelltyp, Nachbarzellen und Zytokineinfluss [5].



**Abb. 3: Biosynthesewege prominenter Lipidmediatoren im Überblick.** Adaptiert und modifiziert von Werner et al. 2019 [Manuskript II].

In der Regel haben die gebildeten LM kurze Halbwertszeiten (Sekunden bis Minuten) und wirken eher lokal an Zellen nahe ihres Bildungsortes. Ihre Funktionen üben sie typischerweise durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs, G protein-coupled receptors), aber auch durch Bindung an nukleäre Rezeptoren (PPARs, Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren) aus [4-6]. Die frühe akute Entzündungsphase wird eher durch Prostaglandine und Leukotriene (wie PGE<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub>, welche die Leukozyteneinwanderung in das Zielgewebe erleichtern) und die spätere Resolutionsphase durch die antiinflammatorischen SPM getragen [2, 5, 67]. Für letztere wurden unter anderem inhibitorische Wirkungen auf PMNL-Migration, Stimulierung der Phagozytose von eingewanderten Bakterien und der Efferozytose apoptotischer Zellen, sowie geweberegenerierende Eigenschaften nachgewiesen [2, 5-7, 34, 68]. Eine Übersicht relevanter LM mit korrespondierenden Zielrezeptoren und biologischen Aktivitäten sind in der nachfolgenden Tabelle exemplarisch zusammengefasst.

Haupt-syntheseweg(e)	Mediator	Rezeptor	Auswahl biologischer Aktivitäten
COX	PGE <sub>2</sub>	EP1, EP2, EP3, EP4	Vasodilatation, Gefäßpermeabilität↑, Fieber, Schmerzempfindlichkeit↑, IL-10↑, TNF-α↓, LM-Klassenwechsel
	PGD <sub>2</sub>	DP1	Vasodilatation, Mastzellenreifung, Neuroprotektion
		DP2	Rekrutierung Eosinophiler und Allergische Antwort
	PGF <sub>2α</sub>	FP	Kontraktion von Glatter Muskulatur; Zyklusregulierung durch Gelbkörperabbau (Progesteron↓, FSH↑, Reifung neuer Follikel)
	PGI <sub>2</sub> (Prostacyclin)	IP	Vasodilatation, Blutplättchenaggregation↓, IL-10↑, TNF-α↓,
	TXA <sub>2</sub>	TP	Vasokonstriktion, Blutplättchenaggregation↑, T-Zell-Aktivierung↓
5-LO	LTB <sub>4</sub>	BLT1	Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten↑, Gefäßpermeabilität↑
		BLT2	Erhöhung epithelialer Barrierefunktion
	LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub>	CYSLT1, CYSLT2	Bronchokonstriktion, Gefäßpermeabilität↑,
CYP	EETs	PPARα, PPARγ	Vasodilatation, Schmerzempfindlichkeit↓, COX2-Expression↓
15-LO/5-LO oder 12-LO/5-LO oder COX <sub>acetyliert</sub> /5-LO	LXA <sub>4</sub> , LXB <sub>4</sub> , 15-epi-LXA <sub>4</sub> , 15-epi-LXB <sub>4</sub>	ALX/FPR2	Infiltration Neutrophiler Granulozyten↓, Efferozytose (Neutrophiler Granulozyten)↑
	RvD1, 15-epi-RvD1	ALX/FPR2, GPR32	Infiltration Neutrophiler Granulozyten↓, Phagozytoseaktivität↑
	RvD1, 15-epi-RvD1, RvD5, RvD3 and 15-epi-RvD3	GPR32	Phagozytoseaktivität ↑
	RvD2	GPR18	Infiltration Neutrophiler Granulozyten↓, Phagozytose- und Efferozytoseaktivität↑
CYP/5-LO oder COX <sub>acetyliert</sub> /5-LO	RvE1, 18-epi-RvE1, RvE2	ChemR23, BLT1 (Antagonist)	Infiltration Neutrophiler Granulozyten↓, Phagozytoseaktivität↑
ALX/FPR2, Lipoxin A <sub>4</sub> Rezeptor/Formyl-Peptid Rezeptor 2; BLT, Leukotrien B <sub>4</sub> Rezeptor; ChemR23, Chemerin-Rezeptor 23; CYSLT, Cysteinyl-Leukotrien Rezeptor; DP, PGD Rezeptor; EETs, Epoxyeicosatriensäuren; EP, PGE Rezeptor; FP, PGF Rezeptor; GPR, G-Protein-gekoppelte Rezeptor; IP, PGI Rezeptor; TP, Thromboxan Rezeptor			

**Tab.1: Lipidmediatoren – Biosynthese, Rezeptoren und biologische Aktivitäten.** Zusammengetragen von Dennis et al. 2015, Stables et al. 2011, Serhan et al. 2013 und Chiang et al. 2015 [5, 6, 69, 70].

Eine Sonderstellung unter den LM ist den Prostaglandinen, insbesondere  $\text{PGE}_2$ , zuzuschreiben. Eine klare Schwarz-Weiß-Kategorisierung in pro- oder antiinflammatorisch ist hier kaum möglich. In frühen Phasen der Entzündung bewirkt  $\text{PGE}_2$  die Rekrutierung und Aktivierung von PMNL, Makrophagen und Mastzellen am Entstehungsort der Entzündung. Später drosselt es die (gewebeschädigende) Immunreaktion durch Verstärkung der Infiltration und Aktivität von regulatorischen T-Zellen, TH2-Zellen und myeloiden Suppressorzellen und Abschwächung der Rekrutierung und Effektorfunktion von TH1-Zellen, cytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen [8]. Interessanterweise ist  $\text{PGE}_2$  auch am sogenannten LM-Klassenwechsel in Richtung verstärkter SPM-Synthese beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass  $\text{PGE}_2$  über erhöhte Konzentrationen von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) zur Hochregulierung und Prozessierung von 15-LO-1-mRNA und gesteigerter 15-LO-Produktbildung (15-HETE = 15-Hydroxyeicosatetraensäure;  $\text{LXA}_4$  = Lipoxin  $\text{A}_4$ ) in PMNL führte [67]. Weiterhin wurde durch  $\text{PGE}_2$  die IL-4 getriggerte Polarisierung von Makrophagen zum M2-Typ (mit typischerweise hochregulierter 15-LO-1) verstärkt [71]. Neben  $\text{PGE}_2$  soll auch dessen Biosynthese katalysierendes Enzym, die COX-2, den LM-Klassenwechsel initiieren können. Neben Prostaglandinen synthetisiert es 15-HETE (1-3%). Diese kann durch Acyltransferasen in Biomembranen (beispielsweise von Makrophagen) eingebaut werden. Ein erneuter Stimulus wie beispielsweise Adenosintriphosphat (ATP) von benachbarten PMNL kann die Hydrolyse eingebauter 15-HETE durch  $\text{cPLA}_{2\alpha}$  und anschließende Umsetzung durch die 5-LO zu Lipoxinen katalysieren [72]. Alles in allem könnte man die COX-2/ $\text{PGE}_2$ -Achse wohl am trefflichsten als immunregulierendes Werkzeug beschreiben. Beispielsweise zeigte die selektive Blockade der COX-2 in einem Arthritis-Mausmodell im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Anhalten der Entzündungssymptomatik. Die zusätzliche Behandlung mit metabolisch stabilen Prostaglandinderivaten führte zur Auflösung der Entzündung [73].

Wirkstoffe, die während entzündlicher Erkrankungen mit der Biosynthese oder Rezeptorbindung von Prostaglandinen und Leukotrienen interferieren, sind klinisch etabliert. COX-hemmende NSAR lindern Schmerz, Fieber und Schwellungen; der 5-LO-Hemmer Zileuton oder die Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptorantagonisten (Montelukast, Zafirlukast) mildern die bronchokonstriktorische Asthmasymptomatik ab [4-6]. Solche Wirkstoffe sind allerdings nicht in der Lage die Progression verschiedener Formen entzündlicher Erkrankungen zu stoppen. Als Ursache wird der große Einfluss anderer bioaktiver Stoffe (beispielsweise Zytokine) sowie die Interferenz mit Biosynthesewegen antiinflammatorischer LM in Betracht gezogen (teilweise identische Synthesenzyme oder gestörter LM-Klassenwechsel) [5].

### 1.5.2 Lipidmediatoren im Krebsgeschehen

In Analogie zur Undurchsichtigkeit und Vielschichtigkeit der Pathophysiologie maligner Erkrankungen im Allgemeinen ist auch das wissenschaftliche Verständnis über die Rolle verschiedener LM in diesem Kontext mitunter noch relativ unklar.

Am eindeutigsten sind noch die Prostaglandine einzuordnen. Insbesondere die protumoralen Eigenschaften von  $\text{PGE}_2$  sind auf breiter wissenschaftlicher Ebene anerkannt. Erhöhte Konzentrationen an  $\text{PGE}_2$  sind in vielen Tumorerkrankungen (Darm-, Lunge-, Brust- sowie Kopf- und Halskrebsvarianten) nachgewiesen und mit schlechter Prognose assoziiert [10, 74]. Molekularbiologisch wurden proliferationsfördernde Eigenschaften durch Aktivierung des Ras-ERK- und des Glykogensynthase-Kinase- $3\beta$ - $\beta$ -Catenin-Signalwegs sowie durch Hochregulierung der Aromatase nachgewiesen. Darüber hinaus wurden Zellüberlebens-triggernde Impulse durch Aktivierung des PI3K-Akt-PPAR $\gamma$ -Weges in-vitro und in-vivo belegt. Außerdem konnten Migration- und Zellinvasion-induzierende Eigenschaften, beispielsweise durch Hochregulierung der Matrixmetalloproteinase MMP2 sowie des Chemokinrezeptors CCR7, gezeigt werden [10]. Mindestens genauso schwer wie diese direkten protumoralen Aktivitäten wiegen die indirekten, über die Tumormikroumgebung vermittelten,  $\text{PGE}_2$ -Einflüsse. Die bereits benannte Drosselung der (antitumoralen) Effektorfunktion von Natürlichen Killerzellen und Cytotoxischen T-Zellen und die Verstärkung immunsuppressiver Aktivitäten von regulatorischen T-Zellen und myeloiden Suppressorzellen steht hier im Vordergrund [8]. Insbesondere kann auch die vor kurzen nachgewiesene  $\text{PGE}_2$ -abhängige Hochregulierung des Liganden PD-1L in TAM und MDSC ein starkes Hindernis zur Tumoreliminierung durch das Immunsystem darstellen [11]. Schließlich bestätigten in-vitro- und in-vivo-Experimente einen großen Beitrag zur verstärkten Gefäßneubildung (Angiogenese). Vermittelt wird dies hierbei über eine Hochregulierung von Faktoren wie VEGF and FGF2 (fibroblast growth factor 2) in entarteten Epithelzellen, Endothelzellen und Immunzellen nach  $\text{PGE}_2$ -Rezeptorbindung. Beide Wachstumsfaktoren können Endothelzellen wiederum zur COX-2 Expression anregen und es kann (neben weiteren hier nicht benannten Mechanismen) zur Amplifizierung der  $\text{PGE}_2$ -Synthese durch  $\text{PGE}_2$  kommen [10, 12]. Für die anderen Prostaglandine ist die Datenlage weniger eindeutig. Während eine PPAR $\delta$ -Bindung eher Tumor-fördernde Wirkungen verursacht, vermittelt die Bindung an den nukleären Rezeptor PPAR $\gamma$  antiproliferative, proapoptotische, differenzierungsfördernde und antiangiogenetische Effekte. Der  $\text{PGD}_2$ -Metabolit 15d-PGJ $_2$  bindet an PPAR $\gamma$  und PGI $_2$  an PPAR $\delta$ , stellvertretend für korrespondierende Effekte dieser Mediatoren in entsprechenden Tumormodellen [10, 13].

Für die 5-LO-Produkte wie LTB $_4$ , Cysteinyl-Leukotriene und 5-HETE sind die Forschungsergebnisse heterogener. Die Expression und Produktbildung von 5-LO sind in

mehreren Krebsarten (darunter Prostata, Niere, Brust, Darm und Pankreas) erhöht. Eine Hauptquelle stellen dabei sehr wahrscheinlich Immunzellen der Tumormikroumgebung dar. LTB<sub>4</sub> zeigte proliferations- und überlebensfördernde Eigenschaften über einen BLT1-ERK- und BLT1-PI3K-Akt-Signalweg in Krebszelllinien sowie angiogenesefördernde Wirkungen in-vitro und in-vivo über verstärkte VEGF-Expression [10, 75]. Auch für 5-HETE und Cysteinyl-Leukotriene wie LTD<sub>4</sub> wurden protumorale Effekte in mehreren Krebszelllinien nachgewiesen [74, 75]. Den womöglich größten Einfluss haben 5-LO-Produkte, insbesondere LTB<sub>4</sub>, auf die Pathogenese maligner Erkrankungen bezüglich ihres Potentials Immunzellen verschiedenster Art zu rekrutieren. Dabei attestierten einige Forschergruppen auf Basis ihrer Ergebnisse dem LTB<sub>4</sub> Tumor-fördernde Wirkungen aufgrund Rekrutierung und Aktivierung von regulatorischen T-Zellen und myeloiden Suppressorzellen [75]. Andere Arbeiten zeigten dagegen einen entscheidenden Beitrag der 5-LO-Produkte zur Anlockung antitumoral-wirkender zytotoxischer T-Zellen auf [76, 77]. Das Ausmaß, inwiefern die 5-LO-Aktivität zeitabhängig die Tumormikroumgebung hinsichtlich Quantitäten und Qualitäten verschiedener Immunzell-Subpopulationen wirklich verändert, muss besser untersucht werden, um das Enzym als gutes Wirkstoffziel erklären zu können.

Vergleichsweise unklar und widersprüchlich sind die Rollen der 12-LO- und 15-LO-Enzyme und ihrer Produkte in der Kanzerogenese. Für die 12-LO und ihr Hauptprodukt 12-HETE sind mitogene Wirkungen auf zahlreiche Zellarten aufgezeigt worden [12, 74]. Für die 15-LO-1 wurden sowohl protumorale als auch antitumorale Effekte nachgewiesen. Beispielsweise fungierte das Enzym als tumorfördernd in Prostatakrebsmodellen, jedoch als Tumorsuppressor in Modellen chronisch myeloischer Leukämie und Darmkrebs [75]. Vor allem in Anbetracht jüngerer Forschungsergebnisse stellt sich das Enzym 15-LO-1 tendenziell eher als Tumorchemmer dar. In zahlreichen Krebsarten ist die Enzymexpression herunterreguliert. Experimentelle Re-Expression in kolorektalen Krebsmodellen resultierte in wachstumshemmenden Effekten in-vitro und in-vivo [78]. Antiproliferative Effekte der 15-LO-1 sind wahrscheinlich mitunter an die Biosynthese-Hauptprodukte 15-HETE und 13-HODE (13-Hydroxyoctadecadiensäure) als PPAR $\gamma$ -Liganden geknüpft [12]. Auch für die komplexer hydroxylierten 15-LO-1-Produkte der SPM-Familien konnten krebshemmende Wirkungen, basierend auf der Drosselung der Tumor-fördernden-Entzündung, nachgewiesen werden [13]. Eine kürzlich publizierte Studie zeigte eindrucksvoll auf, dass (Chemotherapie-induzierte) apoptotische Zelltrümmer Makrophagen zu einem Tumorwachstum-fördernden Zytokinsturm anregen können. Die Resolvine (RvD1, RvD2 oder RvE1) hemmten dabei die Krebsprogression durch verstärkte phagozytotische und efferozytotische Aktivität der Makrophagen und Herunterregulierung proinflammatorischer Zytokine [79]. Die Ausnutzung einer Vielzahl unterschiedlichster Maus-basierter-Krebsmodelle (Transplantation muriner Krebszellen, Transplantation humaner Krebszellen, sich spontan entwickelnde Tumore in

genetisch veränderten Tieren) zur Demonstration der Ergebnisreproduzierbarkeit unterstrichen die Qualität der Studie [80]. Auch in verschiedenen murinen Krebsmodellen, bei denen ein chirurgischer Eingriff durch systemisch-inflammatorische Vorgänge Metastasierung und Auswachsen ruhender Tumorzellen initiierte, stellte sich die präoperative Gabe von Resolvinen (oder COX-1 selektiven Inhibitoren) als positiv heraus. Die Dämpfung unspezifischer systemischer Entzündungsvorgänge bei gleichzeitig gesteigerter T-Zell basierter Immunantwort resultierte in verminderter Metastasierung und gesteigertem Langzeitüberleben [81]. Für das Enzym 15-LO-2 zeigen die vergleichsweise wenigen und vorwiegend auf Prostatakrebsmodellen basierenden Studien überwiegend antitumorale Effekte auf [82]. Eine aktuelle Studie zeigte, dass die 15-LO-2 über verstärkte Lipidperoxidation eine spezielle Form des Zelltodes, die Ferroptose, fördert. Jedoch Stickstoffmonoxid durch Reduktion des katalytisch-wirkenden Eisens der 15-LO-2 und Neutralisation gebildeter Lipidperoxide Zellen vor dieser Ferroptose schützen kann. Im einem murinen Tumormodell zeigten Mäuse mit Knockout der induzierbaren NO-Synthase (NOS2) in ihren Knochenmarkszellen ein signifikant verringertes Tumorgewicht, korrelierend mit einer verringerten Anzahl an Tumor-assoziierten-Makrophagen [83]. Die 15-LO-2 kann womöglich auch durch eine Ferroptose bedingte Reduktion von TAM indirekt antitumoral wirken.

Sehr stark vereinfacht kann man für die Enzyme und deren Biosyntheseprodukte für COX-1/2 hauptsächlich protumorale, für die 5-LO tendenziell ebenfalls eher protumorale und 15-LO-1/2 vorwiegend antitumorale Eigenschaften resümieren.

## **1.6 Testsysteme und Analytik der Lipidmediatoren**

Der methodische Schwerpunkt der hier vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines universell einsetzbaren Testsystems zur Charakterisierung umfassender LM-Profile in Abhängigkeit verschiedener modulierender Faktoren wie niedermolekularen Inhibitoren oder löslichen Faktoren in der Kommunikation verschiedener Zelltypen. Dabei galt es durch die Kombination geeigneter Zellen und Stimuli alle Hauptsynthesewege der für uns interessanten Prostaglandine (COX), Leukotriene (5-LO) und SPM (vor allem 15-LO) zu aktivieren, die produzierten Mediatoren quantitativ aufzureinigen sowie selektiv und sensitiv zu analysieren. In den nachfolgenden zwei Kapiteln wird eine Übersicht über literaturbekannte LM-Testsysteme und Verfahren zur Aufreinigung und Analytik von LM präsentiert.



### 1.6.1 In-vitro- und in-vivo-Testsysteme der Lipidmediatorbiosynthese

Testsysteme für die LM-Analytik umfassen im Allgemeinen in-vitro-, als auch in-vivo-Modelle inklusiver geeigneter Stimuli. Für letztere konnten beispielsweise mit Hilfe von Kombinationen aus Maus und Bakterien (wie *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), Maus und Influenzaviren sowie Zebrafisch und *Mykobakterium marinum* umfassende LM-Profile gemessen und Korrelationen zwischen verschiedenen Mediatoren und Infektionsverläufen aufgestellt werden [34, 70, 84]. In-vivo-Systeme sind zeitaufwendig, für einige wissenschaftliche Fragestellungen ethnisch nicht vertretbar oder zu komplex um den Einfluss spezifischer Faktoren, wie die Kommunikation zwischen zwei konkreten Zelltypen, exakt nachzuvollziehen. Auch wir fokussierten uns daher auf ein in-vitro-Testsystem.

Neben PMNL sind insbesondere Makrophagen (auch aufgrund ihrer enormen Plastizität) die Immunzellen der Wahl für LM-Studien [16, 84, 85]. Neben der Variation des Phänotyps entscheidet vor allem die Art des Stimulus über resultierende LM-Profile der Makrophagen. Eine ambitionierte Studie verglich 16 verschiedene LM-Stimuli in der murinen immortalisierten Makrophagenzelllinie RAW264.7. Die 12 Toll-like-Rezeptor-Agonisten (mit TLR 1-7 und TLR-9 als Zielstrukturen) sowie 2 Agonisten an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die zu einem vorübergehenden Calciumeinstrom führten (PAF und UDP), produzierten alle ein vergleichbares, durch COX-Produkte dominiertes, LM-Profil. Lediglich ATP (2 mM; Agonist an den Purinergen Rezeptoren P2Y und P2X) und Ionomycin (rezeptorunabhängige Aktivität), die einen langanhaltenden Calciumeinstrom initiieren, waren in der Lage die Synthese von 5-LO-Produkten einzuleiten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus 50-minütiger Vorinkubation mit TLR-4-Agonist Kdo2-lipid A, eine homogene LPS (Lipopolysaccharid)-Substruktur, gefolgt von 10-minütiger Stimulierung mit PAF, UDP, Ionomycin oder ATP, wiederum nur für die letzten beiden Substanzen eine stark synergistische Wirkung auf die AA-Freisetzung und 5-LO-Produktbildung hatte [86]. Eine Studie mit GFP-cPLA<sub>2</sub>-Fusionsprotein zeigte, dass proportional zu intrazellulären Calciumkonzentration sich die zelluläre Lokalisation des Proteins änderte (> 100 nM: Golgi; > 210 nM: Golgi, ER und perinukleäre Membranen) und die Menge an freigesetzter AA anstieg [87]. Auch die 5-LO transloziert calciumabhängig an perinukleäre Membranen [88]. Neben die Produktbildungsbeeinflussenden Phosphorylierungen könnte die verstärkte Translokation an kernnahe Biomembranen von cPLA<sub>2</sub> und 5-LO ursächlich für den oben beschriebenen Synergismus sein [86]. Zwei weitere Studien bestätigten eine gesteigerte Eicosanoidbiosynthese durch Vorinkubation mit einem TLR-4-Agonisten und anschließender ATP-Stimulierung. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass mit zunehmender Dauer der TLR-4-Agonist-Vorinkubation (das „Primen“) mehr COX- und weniger 5-LO-Produkte biosynthetisiert wurden. Eine AA-Substratkompetition durch die Hochregulation der COX-2 und der nachgeschalteten mPGES-1 (mikrosomale Prostaglandin E Synthase 1) in Abhängigkeit von der Prime-Dauer gilt als

wahrscheinlich [72, 89]. Neben TLR-Agonisten wie LPS bewiesen sich unter anderem auch der Wachstumsfaktor GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) oder das Zytokin TNF- $\alpha$  als Priming-Agentien und steigerten die 5-LO-Produktsynthese in Leukozyten im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit beispielsweise fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin; stellvertretend für formylierte bakterielle Peptide mit immunogener Wirkung) oder Zymosan. Insbesondere für solche Stimuli, die erst durch Primen erhöhte 5-LO-Produkte aufzeigen, aber nicht durch einen anhalten Calciumeinstrom gekennzeichnet sind, werden verstärkte Phosphorylierungen der cPLA<sub>2</sub> und/oder 5-LO mit erhöhter Produktbildung als Ursache diskutiert [85, 90, 91]. Damit ein Testsystem nicht nur Aussagen über die Modulation proinflammatorischer Prostaglandine und Leukotriene, sondern auch von antiinflammatorischen SPM ermöglichen kann, wäre es von Vorteil auch die Aktivität der 15-LO zu stimulieren. Mit der 15-LO-1 und 15-LO-2 existieren zwei verschiedene Enzyme, die AA an Position 15 oxygenieren können. Beide sind in der Lage neben freien Fettsäuren auch veresterte PUFA in Biomembranen zu oxidieren. Und beide translozieren nach Stimulation mit Calcium-Ionophor (langanhaltender Ca<sup>2+</sup>-Einstrom) zu Membrankompartimenten. Die Unterschiede sind allerdings vielfältiger als ihre Gemeinsamkeiten. Das 15-LO-2-Enzym ist in humanen Makrophagen konstitutiv exprimiert und scheint im Gegensatz zur 15-LO-1 eine untergeordnete Rolle in der Biosynthese von SPM, der Auflösung von Entzündungen sowie der Modulation von Efferozytoseprozessen zu spielen [92]. Die Expression des für uns interessanten 15-LO-1-Enzyms wird durch IL-4 und IL-13 hochreguliert. Neue Erkenntnisse zeigen, dass die Erkennung apoptotischer Zellen die Wirkung dieser Zytokine amplifiziert [93]. Es ist daher wenig verwunderlich, dass das murine Analogon der 15-LO-1 in Monozyten/Makrophagen erst Tage später (während der Resolutionsphase) am Ursprungsort einer Entzündung verstärkt nachweisbar ist [18, 33]. In Analogie zur 5-LO wird die Enzymaktivität der 15-LO-1, neben der Überführung des katalytisch aktiven Eisens in seine Oxidationsstufe +III durch Hydroperoxide, insbesondere durch eine calciumabhängige Membranassoziation gesteigert [94]. Die 12(S)-LO, die vorwiegend in Thrombozyten exprimiert wird und die Blutgerinnung moduliert sowie die 12(R)-LO, die verstärkt in Hautzellen hochreguliert ist und am Aufbau der Wasserbarriere der Epidermis beteiligt ist, spielen in der Biosynthese immunologisch wirkender LM eine untergeordnete Rolle [95].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Makrophagen aufgrund ihrer Plastizität ein hervorragendes Testsystem bezüglich umfassender LM-Biosynthese darstellen und Stimuli mit anhaltenden Calciumeinstrom gute Induktoren der 5-LO-, 15-LO- und COX-Produktbildung sind. Ein begrenzt langes zusätzliches Primen mit TLR-Agonisten kann die Produktbildung erhöhen. Eine ausreichend lange Vorinkubation von Makrophagen mit IL-4 oder IL-13 vervollständigt das enzymatische Spektrum durch verstärkte Expression von 15-LO-1.

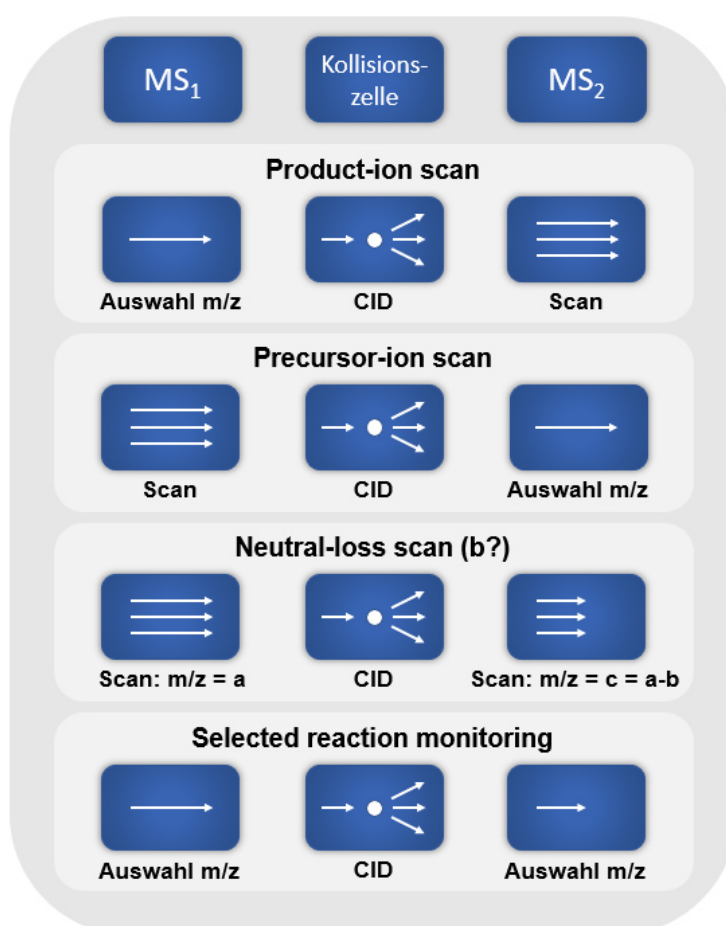
### 1.6.2 Probenaufbereitung und Instrumentelle Analytik

Die enzymatische und nichtenzymatische Oxygenierung diverser PUFA resultiert in zahlreichen verschiedenen LM. Viele dieser Mediatoren haben sich überschneidende oder gegensätzliche Wirkungen. Um biologische Prozesse ausreichend gut erklären zu können, reicht es nicht einzelne Metabolite zu quantifizieren. Es bedarf der Bestimmung komplexer LM-Profile, die die Balance verschiedener oxygenierter Mediatoren zueinander darstellen [14]. Massenspektrometrie basierte Plattformen sind heutzutage Mittel der Wahl in der LM-Analytik. Insbesondere Chromatografie-gekoppelte Verfahren wie mit HPLC (high performance liquid chromatography) und UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), die unterschiedliche Metabolite aufgrund physikochemischer Eigenschaften (Lipophilie, Chiralität, Größe) voneinander trennen und somit identische Mediatoren zeitlich aufkonzentrieren, erlauben massenspektrometrische Analytik von hoher Sensitivität und Selektivität [14, 96, 97]. Die Alternative, sogenannte „Shotgun-Verfahren“, bei denen aufgereinigte Proben ohne chromatografische Vortrennung direkt eingespritzt werden, dienen eher der Hochdurchsatz-Analytik von reichhaltig in der Zelle vorkommenden Metaboliten (wie Glycerolphospholipiden, Glycerolipiden, Sphingolipiden oder Sterinen) [96, 97].

Oxygenierte PUFA werden vornehmlich auf chromatografisch gekoppelten Triple-Quadrupol-Systemen analysiert [14, 86]. Fünf Hauptschritte skizzieren dabei die chronologische Prozessierung: (I) Die Proben geeigneter Testsysteme werden zügig gesammelt und stabil gelagert, sodass nachträglich keine weiteren enzymatischen und nichtenzymatischen Umsätze stattfinden können (Reaktionsstopp und Proteindenaturierung mit eiskalten Lösungsmitteln, Stickstoffbegasung, -80 °C-Lagerung). (II) Die Proben werden durch Verfahren, wie Flüssig-Flüssig- oder Festphasenextraktion weiter aufgereinigt und etwaige Verluste im Zuge der Probenaufarbeitung durch vorherige Zugabe Interner Standards ausgeglichen. (III) Einzelne Metabolite werden in Folge der Flüssigkeitschromatografie aufgetrennt. (IV) Die Analyten werden im sogenannten Elektronenspray-Ionisationsverfahren (ESI) ionisiert. (V) Die entstandenen Ionen können über ihre Masse/Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) im elektrischen Wechselfeld der Quadrupole und mit Hilfe unterschiedlicher Arbeitsmodi des Massenspektrometers identifiziert und quantifiziert werden [14]. Erfolgt ein unverändertes Erfassen der ionisierten Metabolite, spricht man vom „Single-Scan-Modus“ (MS). Werden Ionen im zweiten Quadrupol mittels Stoßgas fragmentiert und die Fragmentierungsprodukte (oder/und dessen Vorstufen) analysiert, handelt es sich um einem „Tandem-Modus“ (MS/MS).

Unterschiedliche MS/MS-Modi (siehe Abb. 4) beantworten dabei verschiedene analytische Fragestellungen [96]. Ein ultrasensitiver MS/MS Modus ist das sogenannte „selected reaction monitoring“ (SRM). Entsprechend des Wechselfeldes lässt man einen definierten Metaboliten ( $m/z$ ) den ersten Quadrupol passieren. Dieser wird im zweiten Quadrupol (Kollisionszelle) fragmentiert. Im dritten Quadrupol wird ein charakteristisches Fragment ( $m/z$ ) zur Quantifizierung selektiert. Werden zyklisch wiederholend mehrere SRM Paare vermessen, wird dies als „multiple reaction monitoring“ (MRM) bezeichnet. Die kombinierte Zuordnung einer definierten Vorstufe ( $m/z$ ), eines

ausgewählten Fragmentierungsproduktes ( $m/z$ ) und einer aus Flüssigkeitschromatografie resultierenden Retentionszeit (min) für jeden Analyten erlauben eine vergleichsweise hohe Sensitivität und Selektivität in der Quantifizierung [14, 86, 96, 97]. Unter Optimierung der benannten fünf Hauptschritte (Probensammlung und Lagerung, Aufreinigung, Flüssigkeitschromatografische Auftrennung, Ionisation der Analyten, Tandem-Massenspektrometrie) konnten LM bis in den dreistelligen Femtogrammbereich ( $> 100$  fg) im humanen Serum, Plasma und lymphatischen Organen nachgewiesen werden [99]. Eine adaptierte Form dieser Probenaufbereitung, die Etablierung einer neuen UPLC-Methode sowie die Verwendung optimierter MS/MS-Parameter zur LM-Analytik für das hauseigene Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (AB Sciex 5500 Q TRAP) gemäß der Referenz „Lipid Mediator Metabololipidomics LC-MS-MS Spectra Book 2016“ [100] sollten zur Optimierung unserer LM-Analytik dienen.



**Abb. 4: Typische MS/MS-Modi.** Adaptiert von Griffiths et al. 2009 [98]. CID, collision induced dissociation

## 2 ZIELSTELLUNG

Die im Zusammenspiel von PLA<sub>2</sub>-, COX-, LO, CYP- und weiteren nachgeschalteten Enzymen entstehenden LM aus AA, EPA und DHA spielen eine wesentliche Rolle in akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen wie Asthma, rheumatoide Arthritis, Atherosklerose und Krebs [4-7]. Vereinfacht sind den Hauptvertretern: den Leukotrienen (5-LO) eher proinflammatorische, den SPM (15-LO und weitere Enzyme) vorwiegend antiinflammatorische und den Prostaglandinen (COX) immunmodulierende (pro- und antiinflammatorische) biologische Aktivitäten zuweisen [2, 5, 6, 8]. Mit dem Wissen, dass die Tumor-fördernde-Entzündung ein Wesensmerkmal und Motor vieler maligner Erkrankungen ist [9], lassen sich mit gewissen Einschränkungen für Leukotriene und Prostaglandine eher protumorale und für SPM vorwiegend antitumorale Eigenschaften ableiten [8, 10-13]. Anstatt einzelne LM zu quantifizieren, bedarf es einer umfassenden Profilierung des LM-Netzwerkes, um komplexe biologische Prozesse gut verstehen zu können [14]. Auch zur Charakterisierung pharmakologischer Interventionen ist ein ganzheitliches Bild notwendig. Denn die in der LM-Biosynthese involvierten Enzyme sind in der Lage mehr als nur ein Substrat umzusetzen [5, 84, 88]. Weiterhin kann ein und derselbe Inhibitor die katalytische Aktivität mehrerer an der LM-Biosynthese beteiligten Enzyme beeinflussen [95, 101]. Nicht zuletzt kann die Inhibition eines Enzymes die kompetitive Umsetzung eines Substrates durch ein anders Enzym einleiten (Shunting) [5, 21, 22, 84]. Makrophagen sind Schlüsselspieler der Angeborenen und Erworbenen Immunabwehr und aufgrund ihrer enormen Plastizität in der Lage ein breites Spektrum an LM zu biosynthetisieren [15, 16]. Außerdem sind sie ein Hauptbestandteil der Tumormikroumgebung und tragen nach Phänotypenwechsel (in Richtung M2-like) maßgeblich zur Tumor-fördernden-Entzündung bei [15, 46, 47]. Das Hauptziel der Arbeit war die Entwicklung und Anwendung eines Makrophagen basierten Testsystems zur Charakterisierung umfassender LM-Profile in Abhängigkeit verschiedener modulierender Faktoren. Genauer spezifiziert lauteten die einzelnen Ziele wie folgt:

1. Charakterisierung der LM-Biosynthese durch verschiedene Stimuli in unterschiedlichen Makrophagenphänotypen (**Manuskript I**)
2. Etablierung eines Entzündungs- und Entzündungsauflösungs-angelegten Testsystems mit umfassender LM-Analytik durch Kombination von geeigneten Testobjekten, Stimulus und optimierter UPLC-MS/MS-Methodik (**Manuskript II**)
3. Prüfung etablierter pharmakologischer Inhibitoren auf das gesamtheitliche LM-Profil im neuen Testsystem mit Rückschlüssen auf Zielstrukturselektivität, Shunting-Effekte und Potenzial zur Entzündungsauflösung (**Manuskript II**)
4. Entwicklung eines Makrophagen-Krebszell-Kokulturmodells und Erforschung kommunikationsbedingter Veränderungen der LM-Biosynthese inklusiver zugrundeliegender Mechanismen (**Manuskript III**)

### 3 MANUSKRIPTE

#### Manuskript I

Human macrophages differentially produce specific resolvins or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity

Oliver Werz\*, Jana Gerstmeier, Stephania Libreros, Xavier De la Rosa, Markus Werner, Paul C. Norris, Nan Chiang & Charles N. Serhan

**Nature Communications**, 2018. 9(1): p. 59.

#### Manuskript II

Targeting biosynthetic networks of the proinflammatory and proresolving lipid metabolome

Markus Werner\*, Paul M. Jordan, Erik Romp, Anna Czapka, Zhigang Rao, Christian Kretzer, Andreas Koeberle, Ulrike Garscha, Simona Pace, Hans-Erik Claesson, Charles N. Serhan, Oliver Werz, and Jana Gerstmeier

**FASEB Journal**, 2019. 33(5): p. 6140-6153.

#### Manuskript III

Communication between human macrophages and epithelial cancer cell lines dictates lipid mediator biosynthesis.

Markus Werner\*, Simona Pace\*, Anna Czapka, Paul M. Jordan, Jana Gerstmeier, Andreas Koeberle, Oliver Werz

**Cellular and Molecular Life Sciences**, 2020 (published online, printed version in progress)

### 3.1 Manuskript I

---

**Human macrophages differentially produce specific resolvin or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity**

Oliver Werz\*, Jana Gerstmeier, Stephania Libreros, Xavier De la Rosa, Markus Werner, Paul C. Norris, Nan Chiang & Charles N. Serhan

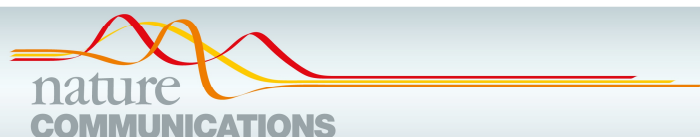
**Nature Communications**, 2018. 9(1): p. 59.

---

Mögliche Stimuli der Lipidmediator (LM)-Biosynthese wurden an Makrophagen getestet. Stärker virulente Varianten von *E. coli* und *S. aureus* stellten sich dabei als ausgezeichnete Aktivatoren aller relevanten LM-Biosynthesewege (COX, 5-LO, 15-LO-1) heraus. Während fast alle verwendeten Stimuli gute Initiatoren der COX-Produktbildung gewesen sind, war die subzelluläre Translokation und Enzymaktivität der 5-LO und 15-LO-1 an einen anhaltenden Calciumeinstrom durch die stärker virulenten Bakterien geknüpft. Entsprechend ihrer enzymatischen Ausstattung zeigten proinflammatorische/antimikrobielle Makrophagen des M1-Typs (COX-2↑) ein Prostaglandin E<sub>2</sub>- und Leukotrien B<sub>4</sub>-dominiertes LM-Profil; während entzündungsauflösende und wundheilungsfördernde Makrophagen des M2-Typs (15-LO-1↑) ein eher SPM-geprägtes antiinflammatorisches Spektrum aufzeigten. Mit dieser Arbeit identifizierten wir erstmals Stimuli, die alle Hauptwege der LM-Biosynthese in isolierten Zellen aktivieren können.

**Eigenanteil:** Aufreinigung humaner Monozyten aus Leukozytenkonzentraten. Differenzierung von Monozyten und Polarisierung zu M1 und M2. Experimentelles Design und Durchführung des Calcium-Imaging in M1 und M2 in Abhängigkeit verschiedener Stimuli. Probenaufbereitung für die LM-Analytik. Datenanalyse und Mitwirken bei der Erstellung des Manuskriptes.

**Relativer Gesamtanteil: 15%**





## ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-017-02538-5

OPEN

# Human macrophages differentially produce specific resolvins or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity

Oliver Werz<sup>1,2</sup>, Jana Gerstmeier<sup>2</sup>, Stephania Libreros<sup>1</sup> , Xavier De la Rosa<sup>1</sup>, Markus Werner<sup>2</sup>, Paul C. Norris<sup>1</sup>, Nan Chiang<sup>1</sup> & Charles N. Serhan<sup>1</sup> 

Proinflammatory eicosanoids (prostaglandins and leukotrienes) and specialized pro-resolving mediators (SPM) are temporally regulated during infections. Here we show that human macrophage phenotypes biosynthesize unique lipid mediator signatures when exposed to pathogenic bacteria. *E. coli* and *S. aureus* each stimulate predominantly proinflammatory 5-lipoxygenase (LOX) and cyclooxygenase pathways (i.e., leukotriene B<sub>4</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub>) in M1 macrophages. These pathogens stimulate M2 macrophages to produce SPMs including resolvins D2 (RvD2), RvD5, and maresin-1. *E. coli* activates M2 macrophages to translocate 5-LOX and 15-LOX-1 to different subcellular locales in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. Neither attenuated nor non-pathogenic *E. coli* mobilize Ca<sup>2+</sup> or activate LOXs, rather these bacteria stimulate prostaglandin production. RvD5 is more potent than leukotriene B<sub>4</sub> at enhancing macrophage phagocytosis. These results indicate that M1 and M2 macrophages respond to pathogenic bacteria differently, producing either leukotrienes or resolvins that further distinguish inflammatory or pro-resolving phenotypes.

<sup>1</sup>Center for Experimental Therapeutics and Reperfusion Injury, Department of Anesthesia, Perioperative and Pain Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, 60 Fenwood Road, BTM 3016, Boston, MA 02115, USA. <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Friedrich-Schiller-University Jena, Philosophenweg 14, 07743 Jena, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.W. (email: [oliver.werz@uni-jena.de](mailto:oliver.werz@uni-jena.de)) or to C.N.S. (email: [cserhan@bwh.harvard.edu](mailto:cserhan@bwh.harvard.edu))



## ARTICLE

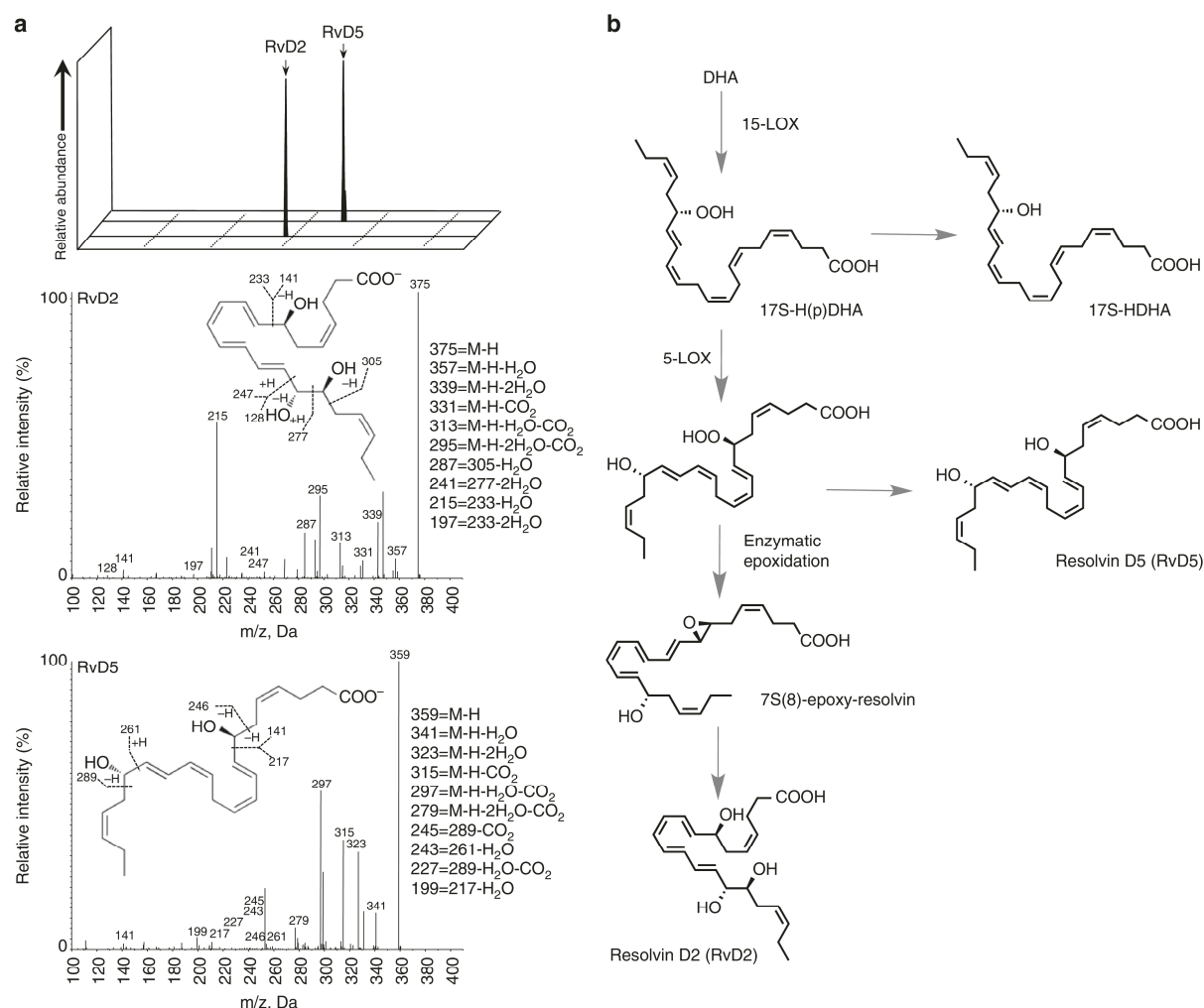
NATURE COMMUNICATIONS | DOI: 10.1038/s41467-017-02538-5

Acute inflammation is a host-protective response to infection that can enable elimination of the invading micro-organism and facilitate repair of damaged tissue<sup>1</sup>. Initiation and resolution of inflammation are tightly regulated by potent lipid mediators (LM) that can lead to either chronicity or self-resolving inflammation<sup>2,3</sup>. Arachidonic acid (AA)-derived prostaglandins (PG) and leukotrienes (LT) are formed via cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (LOX) pathways and have pivotal functions in initiation of acute inflammation<sup>2</sup>. The temporally produced specialized pro-resolving mediators (SPM) actively stop inflammation to promote resolution of inflammation and tissue regeneration<sup>3</sup>. The SPM superfamily includes lipoxins (LX) biosynthesized from AA, E-series resolvins from eicosapentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA)-derived D-series resolvins, protectins, and maresins<sup>3</sup> that are each produced in humans<sup>3,4</sup>.

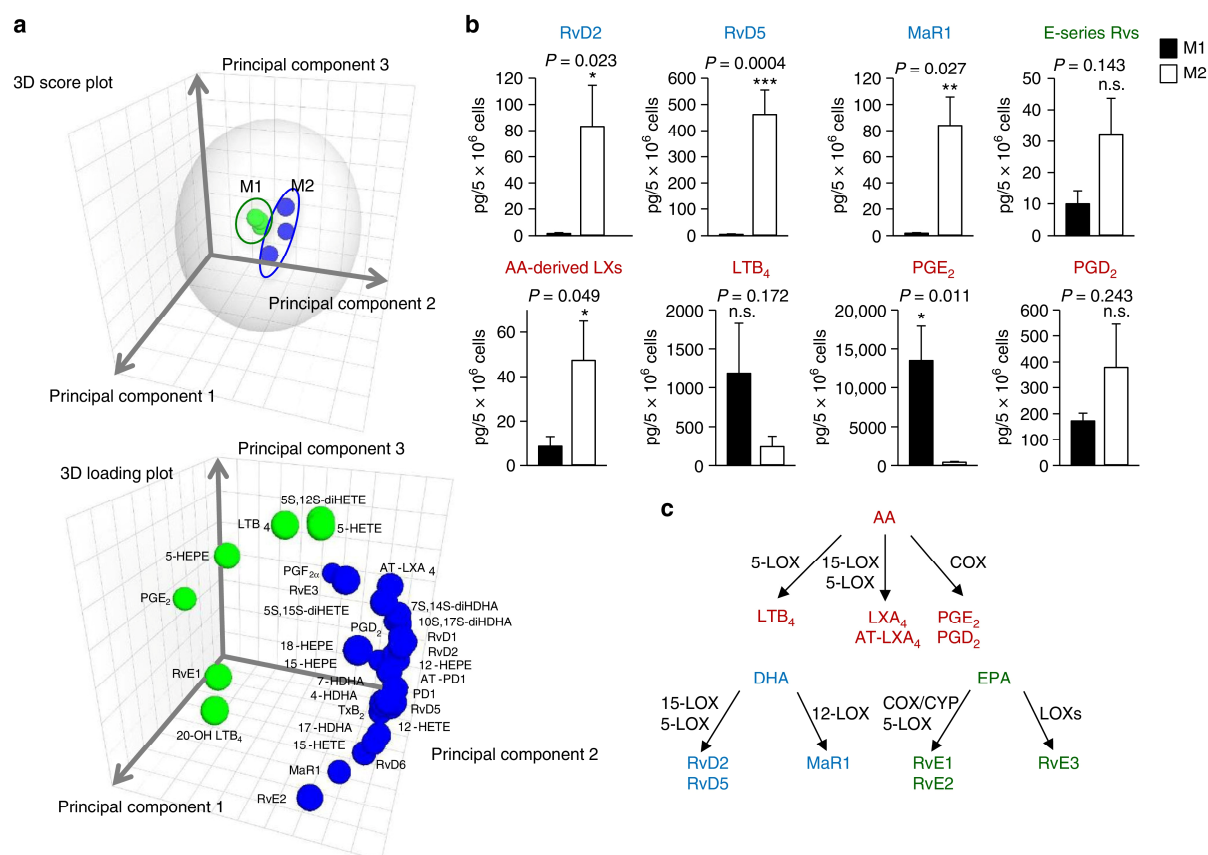
Chronic inflammation is a central component of numerous widespread diseases, including atherosclerosis, cancer, type 2 diabetes, and Alzheimer's disease that requires therapeutic targeting of the inflammatory response and its resolution<sup>1,5</sup>. As controlled resolution of inflammation is a process that can limit

disease chronicity, SPM with dual anti-inflammatory and pro-resolving properties are potential new therapeutics. Along these lines, SPM are host protective in bacterial infections that also lower antibiotic requirements<sup>6,7</sup>. Bacterial infections temporally regulate inflammation-initiating eicosanoids as well as pro-resolving LM during murine peritonitis<sup>6</sup>. Macrophages are central in orchestrating infectious inflammation towards resolution and are actively involved in the clearance of bacteria<sup>8</sup>. Human macrophage phenotypes (M1 and M2) each generate distinct LM signature profiles during polarization. Namely, inflammation-initiating LTB<sub>4</sub> and PG are produced in abundance by M1 and pro-resolving LM such as the SPM dominate M2 macrophages<sup>9</sup>. The mechanism for selective LM biosynthesis during infections to produce eicosanoids vs. SPM has not yet been elucidated.

Here, we report that pathogenic bacteria activate human macrophages for differential production of LM from endogenous substrates. Production of LM by macrophage LOX pathways depends on bacterial pathogenicity and on intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization, while non-pathogenic *Escherichia coli* produces predominantly PG. Our results demonstrate that macrophage polarization dramatically changes the temporal LM biosynthesis



**Fig. 1** Identification and biosynthetic pathway of RvD2 and RvD5. **a** Human M1 and M2 ( $5 \times 10^6$  cells/ml PBS + Ca/Mg) were incubated for 90 min with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio 1:50) at 37 °C. Lipid mediators were isolated by SPE and analyzed by LC-MS-MS. Representative MRM and MS-MS of RvD2 and RvD5 from  $n = 7$ . **b** Biosynthetic pathway of RvD2 and RvD5 from DHA



**Fig. 2** M1 and M2 macrophages exposed to *E. coli* produce differential lipid mediators. Human M1 and M2 ( $5 \times 10^6$  cells/ml PBS + Ca/Mg) were incubated for 90 min with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio, 1:50) at 37 °C. Lipid mediators were isolated by SPE and analyzed by LC-MS-MS. **a** PCA of the lipid mediator profile (SPM, PG, LTB<sub>4</sub>) of M1 and M2. Upper panel: 3D score plot; lower panel: 3D loading plot. **b** Selected values of lipid mediators formed by M1 and M2 exposed to *E. coli*. Data are given as means  $\pm$  S.E.M,  $n = 7$  (RvD2, RvD5, MaR1, AA-derived LX, LTB<sub>4</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>),  $n = 5$  separate donors (E-series resolvins). n.s., not significant ( $P > 0.05$ ); \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  M1 vs. M2 as determined by two-tailed *t* test. **c** Schematic representation of the respective LM biosynthetic pathways

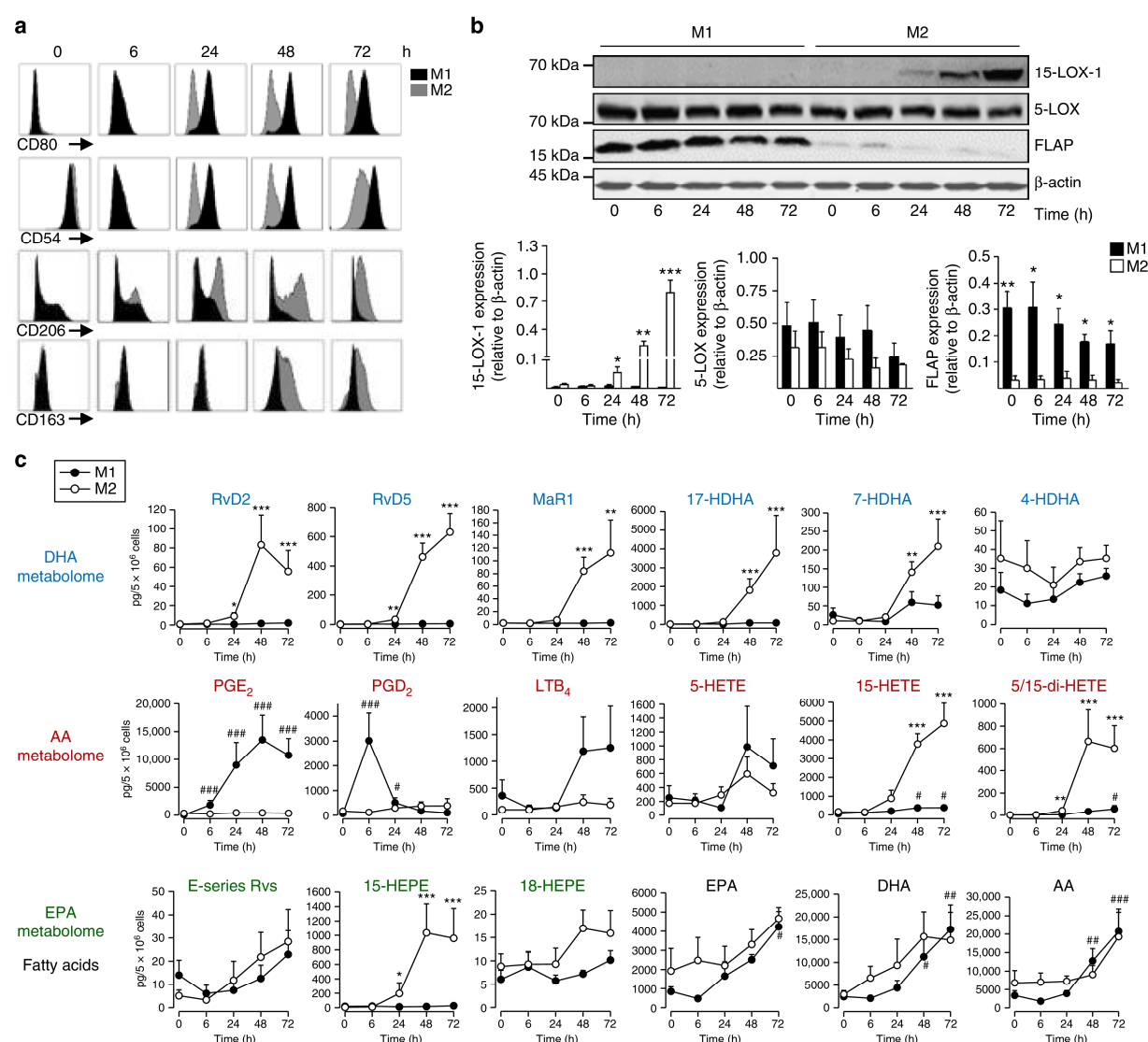
in response to pathogenic bacteria. Also, we identify a molecular basis for the divergent LM signature profiles between LT vs. SPM biosynthesis that directly affects macrophage host defense.

## Results

**Bacteria elicit differential LM formation in M1 and M2.** To address potential differences in LM profiles by macrophages, we prepared human peripheral blood monocytes differentiated with GM-CSF (6 days) and polarized by lipopolysaccharide (LPS) plus interferon- $\gamma$  (INF $\gamma$ ) (48 h) to M1, or for M2 with M-CSF (6 days) plus IL-4 (48 h) which are widely used protocols for obtaining these phenotypes in vitro, though they are not necessarily representative of in vivo tissue-specific macrophages<sup>10</sup>. Incubations of these macrophage subtypes with pathogenic *E. coli* (serotype O6:K2:H1) and targeted LM metabololipidomics of supernatants using LC-MS-MS revealed pronounced biosynthesis of 34 distinct LM from the endogenous substrates AA, DHA, and EPA that were each identified (see Supplementary Tables 1 and 2) based on published criteria (i.e., matching chromatographic retention times (RTs), fragmentation patterns, and six characteristic and diagnostic ions<sup>9,11</sup>). Figure 1a reports the identification of resolvin (Rv)D2 and RvD5 biosynthesized from endogenous substrate from M2 macrophages (see Fig. 1b for biosynthetic scheme). Quantitation of LM using signature ion

pairs obtained via multiple reaction monitoring (MRM) revealed striking differences in the bacteria-elicited LM metabolomes between the M1 and M2 phenotypes (Supplementary Tables 1–3) that was confirmed using unbiased principal component analysis (PCA; Fig. 2a). The M1 and M2 macrophages were each associated with distinct LM (Fig. 2a). M1-derived LM associated with a PG and LT cluster, whereas SPM and their precursors from M2 macrophages gave a specific cluster of pro-resolving LM (Fig. 2a). Flow cytometric analyses of the surface markers CD54 and CD80 for M1, and CD163 and CD206 for M2 confirmed polarization (Supplementary Fig. 1). In response to *E. coli*, M2 produced SPM, specifically RvD2, RvD5, and maresin (MaR)1 (83, 462, and 84 pg/5  $\times 10^6$  cells, respectively) that were produced to a much lesser extent by M1 (1.6, 4.7, and 2.1 pg/5  $\times 10^6$  cells). Of note, M2 produced similar amounts of SPM such as RvD5 vs. LTB<sub>4</sub> (Fig. 2b, Supplementary Tables 1 and 2). Levels of E-series resolvins and AA-derived LX were also higher in M2 vs. M1 (Fig. 2b, Supplementary Tables 1 and 2). This contrasts the M1 macrophage LM profile where PG, especially PGE<sub>2</sub>, and LTB<sub>4</sub> clearly dominated the M1 phenotype (Fig. 2b).

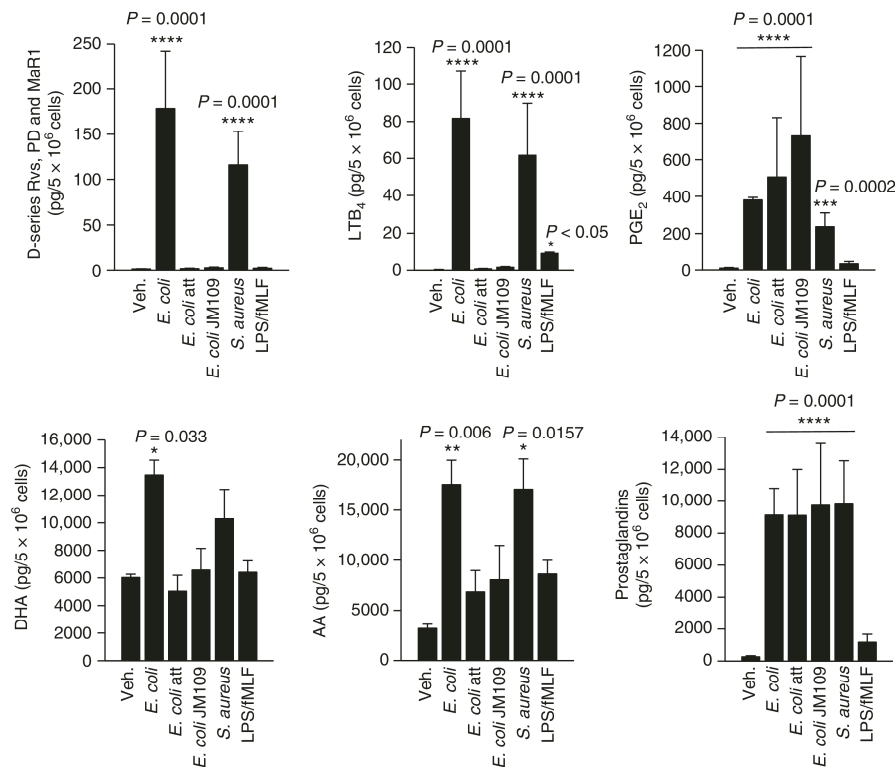
Among the >30 LM produced by *E. coli*-challenged M1 and M2 macrophages, only approximately half were identified in the absence of *E. coli* challenge. In these incubations, the LM levels were essentially <10% of *E. coli*-challenged cells (Supplementary



**Fig. 3** Temporal macrophage polarization and lipid mediator pathway induction. Human monocytes were differentiated by GM-CSF or M-CSF (20 ng/ml, each) for 6 days. Cells were either polarized with 100 ng/ml LPS plus 20 ng/ml IFN- $\gamma$  ( $M_{GM-CSF}$ ) to obtain M1 or with 20 ng/ml IL-4 ( $M_{M-CSF}$ ) to obtain M2. After the indicated times, cells were analyzed for **a** surface expression of polarization markers for M1 (CD54, CD80) and M2 (CD206, CD163) at 0–72 h intervals by flow cytometry; representative histograms from  $n = 4$  separate donors, **b** expression of 5-LOX, 15-LOX-1, FLAP, and  $\beta$ -actin by western blot (upper panel), and densitometric analysis thereof (lower panels). Results are given as means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  separate donors, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  M1 vs. M2 as determined by two-tailed  $t$  test. **c** Lipid mediator formation after incubation of M1 and M2 with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio 1:50) in PBS + Ca/Mg for 90 min at 37 °C after the indicated time points during polarization; formed lipid mediators were isolated by SPE and analyzed by LC-MS-MS. Results are given as means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  (0 and 6 h),  $n = 5$  (24 and 72 h), and  $n = 7$  separate donors (48 h). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  vs. 0 h, data were log transformed for statistical analysis using one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test

Tables 1 and 2). Other inflammatory agonists, such as phagocytic stimuli (serum-treated zymosan) or Toll-like receptor (TLR)-chemotactic GPCR challenge (LPS—*N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF)) primarily stimulated the formation of PG in M1 and only small amounts of LOX-derived LM as compared to *E. coli* challenge (Supplementary Fig. 2). Formation of LM by *E. coli* themselves (incubated alone) was not detected in these experiments. Hence, bacteria can activate human macrophages to preferentially produce pro-inflammatory eicosanoids following M1 polarization and to biosynthesize SPM following M2 polarization.

**Macrophage phenotype-specific LM-SPM pathways and profiles.** The differences in LM profiles of M1 and M2 prompted us to determine the temporal relationships between (i) induction of macrophage phenotype, (ii) LM profiles upon *E. coli* challenge, and (iii) expression of proteins involved in LM-SPM biosynthesis. Differentiated macrophages (Methods) were polarized and assessed at 0, 6, 24, 48, and 72 h. CD54 and CD80 surface expression was evident after 24 up to 72 h in M1 but not apparent in M2 (Fig. 3a). CD206 increased within 6–24 h in M2, while CD163 was first markedly expressed after 48 h, but was absent in the M1 macrophages (Fig. 3a). In line with the temporal



**Fig. 4** M2 macrophages release specific lipid mediators in response to pathogenic bacteria. Human monocyte-derived M2 ( $5 \times 10^6$  cells/ml PBS + Ca/Mg) was incubated with *E. coli* (O6:K2:H1), attenuated *E. coli* (O6:K2:H1), non-pathogenic *E. coli* strain JM109, or *S. aureus* (ratio macrophages:bacteria 1:50, each) at 37 °C for 180 min, or with 100 ng/ml LPS plus 100 nM fMLF for 60 min. Lipid mediators were isolated by SPE and analyzed by LC-MS-MS. D-series resolvins include RvD1, RvD2, RvD5, and RvD6, and prostaglandins include PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, and PGF<sub>2α</sub>. Results are given as means ± S.E.M.,  $n = 3$  separate donors. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , and \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs. vehicle control (veh.), data were log transformed for statistical analysis using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test

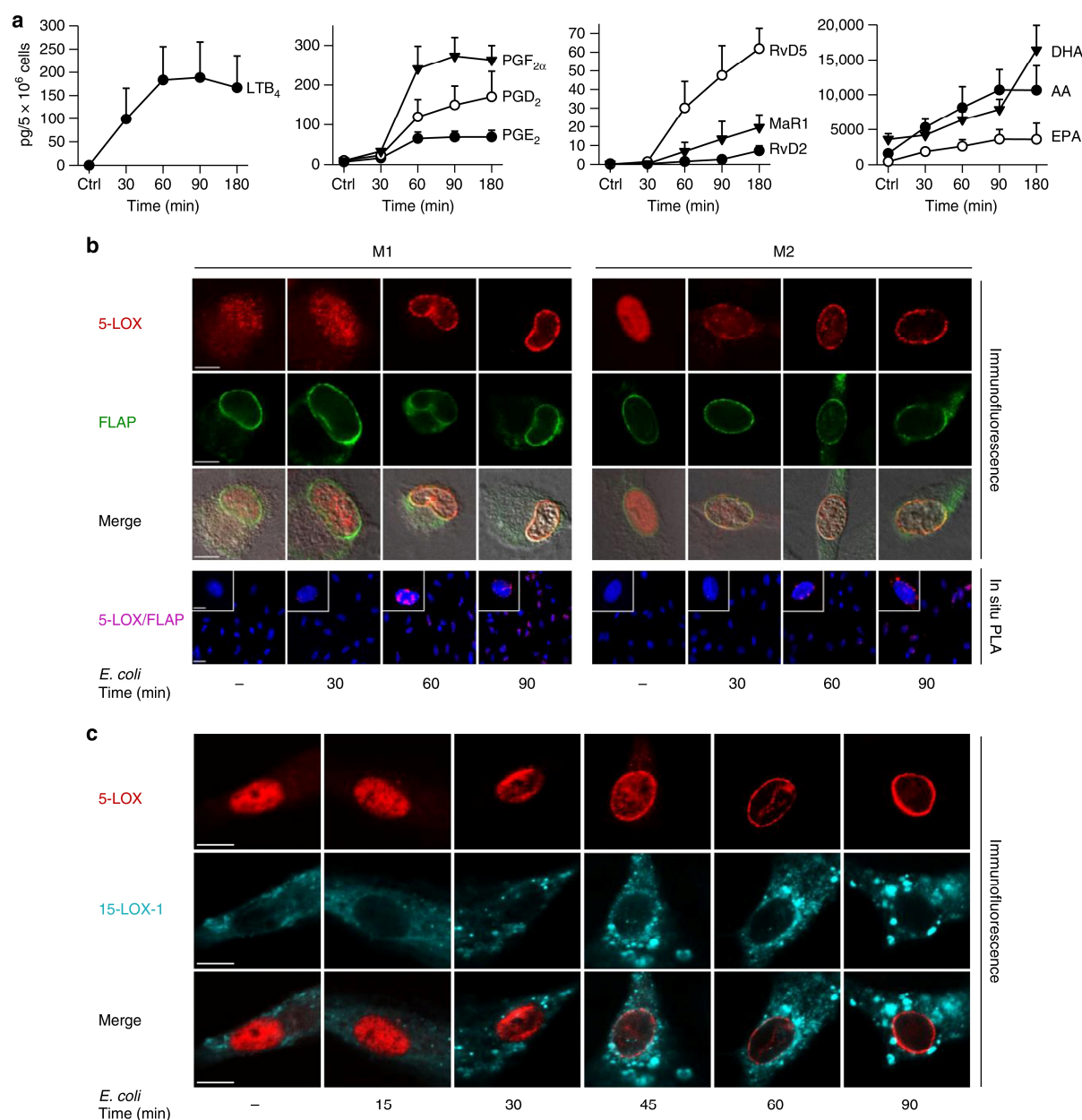
expression of CD163, 15-LOX-1 protein was strongly induced in the M2 at 48 h but not in M1 macrophages (Fig. 3b, Supplementary Fig. 3). While 5-LOX was consistently found in both subtypes, 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) was lower in M2 vs. M1 (Fig. 3b, Supplementary Fig. 3). LM metabolomics of *E. coli*-challenged M2 revealed substantial RvD2, RvD5, and MaR1, as well as 7-hydroxy-DHA (HDHA) and 17-HDHA at 48 and 72 h of polarization (Fig. 3c), correlating with marked 15-LOX-1 expression. A similar pattern was obtained for 15-LOX-1-derived 15-HETE, 15-HEPE, and 5,15-di-HETE, whereas 4-HDHA generation was essentially unchanged. Temporal formation of 5-LOX-derived LTB<sub>4</sub> and 5-HETE was clearly different to 15-LOX-1 products and dominated in M1 (Fig. 3c). The 5-LOX in conjunction with 15-LOX-1 produces RvD2, RvD5, and 5,15-di-HETE (Fig. 2c). In M2 macrophages the presence of 15-LOX-1 clearly determined the temporal biosynthesis of these SPM. Note that the formation of E-series resolvins and its precursor 18-HEPE was higher in M2 vs. M1, and apparently did not increase with polarization of the cells (Fig. 3c). PGD<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> were produced by M1 cells that were polarized for 24 h, with a peak of PGD<sub>2</sub> at 6 h, exceeding its formation in M2, while at 48 or 72 h, formation of PGD<sub>2</sub> (but not of PGE<sub>2</sub>) dominated in M2. Of interest, *E. coli* challenge stimulated release of AA, EPA, and DHA that each increased during polarization without apparent differences between M1 vs. M2. Thus, M1 polarization culminates in proinflammatory PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> formation upon bacterial challenge, while acquiring an M2 phenotype is accompanied by

substantial expression of 15-LOX-1 and low expression of FLAP along with a high capacity to biosynthesize SPM.

#### LOX-mediated LM formation requires bacterial pathogenicity.

Since *E. coli* stimulated higher levels of LM including SPM vs. individual PAMPs derived from Gram-negative bacteria, e.g., LPS, we questioned whether pathogenicity of bacteria is also conferred by macrophages to produce LM. Compared to pathogenic *E. coli* (O6:K2:H1), the profile and magnitude of LM formed in M2 challenged by *Staphylococcus aureus* was similar (Fig. 4). However, neither attenuated *E. coli* (30 min UV irradiation) nor the non-pathogenic *E. coli* strains JM109 (Fig. 4) or BL21 (Supplementary Fig. 6) elicited LOX-mediated formation of either SPM or LTB<sub>4</sub>. Also, elevation of DHA and AA release was moderate. Phagocytosis of bacteria can elicit LM formation<sup>12</sup>. Blocking phagocytosis by treatment of M2 with cytochalasin B or D prior to *E. coli* challenge did not prevent the formation of RvD5, LTB<sub>4</sub>, or PGE<sub>2</sub> (data not shown). Surprisingly, COX-derived PG were produced regardless of the pathogenicity of bacteria. LPS plus fMLF slightly stimulated formation of PG and LTB<sub>4</sub>, and hardly of LOX-derived SPM in M2 (Fig. 4). We conclude that bacterial pathogenicity is required for LOX-mediated LM production in macrophages, while non-pathogenic bacteria stimulate only PG formation, implying differential activation of LOX and COX pathways upon bacteria challenge.





**Fig. 5** Time course of *E. coli*-induced lipid mediator release and lipoxygenase activation. Human M1 or M2 ( $5 \times 10^6$  cells/ml PBS + Ca/Mg) was incubated with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50) at 37 °C for the times indicated. As control (ctrl), cells were incubated at 37 °C for 180 min (**a**) or 90 min (**b**, **c**) without *E. coli*. **a** Formed lipid mediators in M2 were isolated by SPE and analyzed by LC-MS-MS. Data are given as means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$  separate donors. **b**, **c** Subcellular redistribution of 5-LOX and FLAP in M1 and M2 (**b**) or 5-LOX and 15-LOX-1 in M2 (**c**). After exposure to *E. coli* for the indicated times, cells were fixed, permeabilized, and incubated with antibodies against 5-LOX (red), 15-LOX-1 (cyan-blue), and FLAP (green); scale bars = 5  $\mu$ m. **b** In situ interaction of 5-LOX and FLAP in M1 and M2 (lower panel); scale bars = 5  $\mu$ m (insets) and 10  $\mu$ m (overview). Proximity ligation assay (PLA) was performed after exposure of cells to *E. coli* after the indicated times. DAPI (blue) was used to stain the nucleus and in situ PLA signals (magenta dots) visualize 5-LOX/FLAP interaction. Results shown for one single cell are representative for ~100 individual cells analyzed in  $n = 3$  independent experiments (separate donors)

**Temporal LM-SPM production and LOX translocation.** During bacterial infections in mice, inflammation-initiating LT and PG are rapidly formed, while SPM generation is delayed and peaks at the resolution phase<sup>6,13</sup>. We asked if temporal LM-SPM formation would also occur in human macrophages exposed to pathogenic *E. coli* (O6:K2:H1) and correlate with activation of respective LOX (5-LOX vs. 15-LOX). Here, both LTB<sub>4</sub> and PG

were rapidly formed, reaching half-maximal levels ( $t_{50\%}$ ) after 30–50 min, with plateau at 60–90 min (Fig. 5a). In contrast, RvD2, RvD5, and MaR1 first appeared after 60 min and continuously increased up to 180 min.

The Ca<sup>2+</sup> ionophores (e.g., A23187), GPCR ligands (e.g., fMLF and C5a), or zymosan cause 5-LOX translocation to the nuclear membrane and interaction with FLAP to activate LM formation

(Fig. 5b). Exposure of both M1 and M2 to pathogenic *E. coli* caused 5-LOX translocation to the nuclear membrane within 30–60 min, co-localizing with FLAP (Fig. 5b) correlating with LTB<sub>4</sub> formation (Fig. 5a). In human monocytes and neutrophils, 5-LOX interacts with FLAP upon stimulation with Ca<sup>2+</sup> ionophore<sup>16</sup>. Using proximity ligation assay (PLA), we found



## ARTICLE

NATURE COMMUNICATIONS | DOI: 10.1038/s41467-017-02538-5

perinuclear 5-LOX/FLAP complexes in both M1 and M2 macrophages at 30 min after exposure to *E. coli*, with maximal signals at 90 min and slightly less intensities in M2 (Fig. 5b). The 15-LOX-1 was predominantly cytosolic in M2 cells and *E. coli* caused punctuated accumulation of 15-LOX-1 within the cytosol, while 5-LOX within the same cells localized at the nuclear membrane (Fig. 5c). LPS-fMLF-treatment of M1 or M2 macrophages did not evoke LOX translocation (Supplementary Fig. 4). The localization of 15-LOX-1 in M1 cells could not be assessed, likely because of low 15-LOX-1 expression (Fig. 3b). Thus, *E. coli* activates temporal translocation of 5-LOX and 15-LOX-1 to different subcellular locales in macrophages, correlating with the differential time course of eicosanoid vs. SPM formation.

Next, we found that a widely used FLAP inhibitor (MK886 at 100 nM) prevented *E. coli*-induced 5-LOX/FLAP complex assembly (Supplementary Fig. 5) as well as reduced the formation of 5-LOX-dependent LM from AA (i.e., LTB<sub>4</sub> and its transomers, 5-HETE, 5,15-diHETE, as well as LXA<sub>4</sub>) in M1 or M2, as expected (Supplementary Fig. 5). Complexes of 15-LOX-1 with 5-LOX or 15-LOX-1 with FLAP were not detectable by PLA (not shown). MK886 did not inhibit formation of SPM from DHA in M2 (e.g., RvD5, protectin D (PD)1, MaR1), nor production of 15-LOX-1-derived 15-HETE, 15-HEPE, or 17-HDHA pathway markers (Supplementary Fig. 5). These results suggest that FLAP was not required for biosynthesis of DHA-derived SPM including RvD5, MaR1, and PD1. MaR1 and 7s,14S-diHDHA from the maresin pathway are biosynthesized via initial oxygenation by the human 12-LOX and their biosynthesis is independent of 5-LOX<sup>17,18</sup>. Also, PD1 biosynthesis is initiated via the 15-LOX-1 and does not require 5-LOX<sup>3,19</sup>. Thus, FLAP is not involved in the biosynthesis of PD1, MaR1, or 7S, 14S-diHDHA and MK886 did not affect the production of their pathway markers (i.e., 17-HDHA and 14-HDHA).

**Role of Ca<sup>2+</sup> for bacterial LOX activation.** Translocation and binding of 5-LOX and 15-LOX-1 to membranes and related LM formation depends on Ca<sup>2+</sup> ions<sup>14,15</sup>. Compared to fMLF or ionomycin, exposure of M1 and M2 to pathogenic *E. coli* (O6:K2:H1) caused delayed elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) (Fig. 6a), correlating with temporal LOX translocation (Fig. 5b, c). Non-pathogenic *E. coli* (attenuated or the BL21 strain) failed to elevate [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Fig. 6a) and to induce 5-LOX/15-LOX-1 translocation (Fig. 6b) in macrophages. Removal of Ca<sup>2+</sup> (using 0.5 mM EDTA and 20 μM BAPTA/AM) impeded translocation of 5-LOX and 15-LOX-1 in response to pathogenic *E. coli* (Fig. 6b) and also abolished LOX-dependent LM formation, while PG were still formed to some extent (Supplementary Fig. 6). Thus, *E. coli*-induced LOX activation is Ca<sup>2+</sup> dependent and correlates to the ability of bacteria to elevate [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

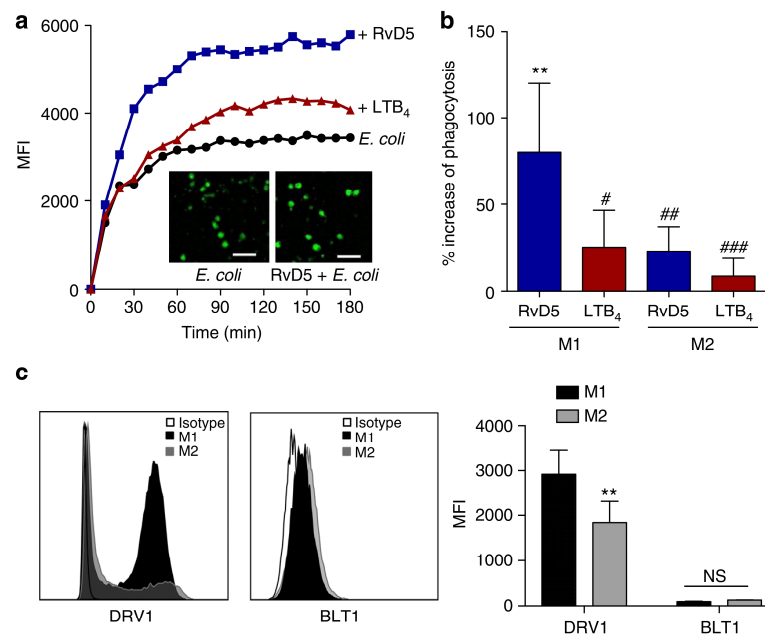
**RvD5 vs. LTB<sub>4</sub> function in bacterial phagocytosis.** The differences in the *E. coli*-induced LM profiles in M1 and M2 support

different roles of these macrophage phenotypes in initiation or propagating inflammation (M1) and resolution (M2). While M1 exposed to *E. coli* produced 250-fold higher levels of pro-inflammatory LTB<sub>4</sub> vs. pro-resolving RvD5, in M2 the formation of RvD5 dominated over LTB<sub>4</sub> (Supplementary Table 1). To address the bacterial killing capacity of M1 and M2, the macrophages were incubated with *E. coli* (ratio 1:50) for 2 h and bacterial titers were determined. The live bacterial titers, i.e. colony forming units (CFU), recovered from M2 (43.8 ± 8.1 × 10<sup>6</sup>) were ~40% lower than CFU from M1 (74.8 ± 13.6 × 10<sup>6</sup>; *P* < 0.05), indicating that M2 had higher bacterial killing capacity than the M1 macrophages. Next, we examined the actions of RvD5 vs. LTB<sub>4</sub> in regulating phagocytosis. In M1 macrophages, RvD5 (10 nM) enhanced phagocytosis of fluorescent-labeled *E. coli* by ~70% compared to *E. coli* alone, exceeding the effect of LTB<sub>4</sub> (10 nM) (Fig. 7a, b). By comparison, neither RvD5 nor LTB<sub>4</sub> increased M2 macrophage phagocytosis of *E. coli*. These potencies of RvD5 and LTB<sub>4</sub> correlated with the expression levels of their high-affinity GPCRs (i.e., RvD1 receptor (DRV1/GPR32) for RvD5 and LTB<sub>4</sub> receptor (BLT1) for LTB<sub>4</sub>) assessed by flow cytometry. Thus, DRV1 was strongly expressed on M1 and to a minor extent on M2, whereas BLT1 was only moderately expressed on both macrophage phenotypes (Fig. 7c). These results demonstrated that RvD5 is a potent stimulator of phagocytosis with M1 macrophages that positively correlates with surface expression of DRV1.

## Discussion

In the present report, we demonstrate that pathogenic bacteria are able to evoke phenotype-specific LM signatures from M1 and M2 macrophages produced from endogenous substrates. These results with human macrophages are consistent with temporal formation of distinct LM obtained during bacterial infections in mice in vivo where different LM are biosynthesized during initiation (such as PG and LT), while SPM (resolvins, protectins, and maresins) are produced and function during resolution of inflammation to accelerate the termination of the response<sup>6,13</sup>. Inflammation-initiating 5-LOX and COX products were produced by pathogenic *E. coli* or *S. aureus* predominantly in M1, whereas in M2 the pathogens activated an abundant production of bioactive SPM from endogenous substrates via 15-LOX-1. Of interest, only pathogenic bacteria stimulated LOX-mediated LM-SPM production along with Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation of 5-LOX and 15-LOX-1. Importantly, these actions were not mimicked by the isolated bacterial components namely LPS or fMLF. Hence, divergent temporal and spatial cellular regulation of LOX pathways in M1 and M2 evoke phenotype-specific LM profiles after bacteria challenge. These distinct LM signal profiles might constitute crucial factors that can help to determine different functions of pro-inflammatory M1 macrophages vs. pro-resolving M2 phenotype<sup>20</sup>. These signature profiles of LM-SPM that proved to be dependent on the pathogenicity of *E. coli* or *S.*

**Fig. 6** *E. coli* elevates [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in M1 and M2 and Ca<sup>2+</sup> is required for LOX translocation. **a** Measurement of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Fura-2/AM-loaded M1 or M2 in PBS containing 1 mM Ca<sup>2+</sup> was treated with 1 μM fMLF, 2 μM ionomycin or vehicle (0.1% DMSO) for 10 min or with *E. coli* (O6:K2:H1), attenuated *E. coli* (O6:K2:H1), or non-pathogenic *E. coli* strain BL21 (ratio 1:50, each), or PBS + Ca/Mg as vehicle at 37 °C for up to 90 min. The ratio of absorbance at 340 vs. 380 nm reflecting [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is given as percentage of cells that were lysed with Triton X-100 (=100% control). Data are given as means ± S.E.M., *n* = 4 separate donors. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001 vs. *t* = 0 s or min, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. **b** Subcellular redistribution of 5-LOX and FLAP in M1 and M2 (upper panel) or 5-LOX and 15-LOX-1 in M2 (lower panel) in the presence or absence of Ca<sup>2+</sup>. M1 or M2 (1 × 10<sup>6</sup> cells/ml) was incubated with *E. coli* (O6:K2:H1) or non-pathogenic *E. coli* strain BL21 (ratio 1:50, each) in PBS + Ca/Mg or PBS plus 0.5 mM EDTA and 20 μM BAPTA/AM at 37 °C as indicated. Cells were then fixed after 90 min, permeabilized, and incubated with antibodies against 5-LOX (red), 15-LOX-1 (cyan-blue), and FLAP (green); scale bars = 5 μm. Results shown for one single cell are representative for ~100 individual cells analyzed in *n* = 3 independent experiments (separate donors)



**Fig. 7** RvD5 stimulates phagocytosis of *E. coli* in M1 vs. M2 human macrophages. **a** Effects of RvD5 and LTB<sub>4</sub> on phagocytosis of *E. coli* by M1. Results are mean fluorescence of four fields/well from one representative donor (inset, representative fluorescent image); scale bar, 50 μm. **b** % Increase of phagocytosis above vehicle control (*E. coli* alone) at 180 min; mean ± S.E.M. of *n* = 4 separate donors. \*\**P* = 0.001 vs. vehicle, #*P* = 0.028, ##*P* = 0.021, ###*P* = 0.003 vs. M1 incubated with RvD5 using one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test. **c** Surface expression of DRV1 (GPR32) and BLT1 in M1 and M2 by flow cytometry. Left panel: representative overlays histogram plots gated on M1 or M2 for DRV1 or BLT1 surface expression. Right panel: quantification of expression of DRV1 and BLT1 in M1 and M2. Results are obtained from *n* = 6 separate donors, data are means ± S.E.M. \*\**P* = 0.0034 and NS = 0.5838, M1 vs. M2 as determined by two-tailed *t* test

*aureus* could each contribute to the regulation of infections in humans given the potent actions of these mediators in vivo<sup>1–3</sup>.

During polarization, M1 and M2 acquired the sequential expression of heterogeneous LM pathways, where the inflammation-initiating COX-2- and 5-LOX-mediated pathways were rapidly induced and predominated in M1. The M1 cells express more FLAP than M2. The 15-LOX-1 is essentially absent in M1, and thus SPM (i.e., RvD5, 7S,14S-diHDHA, and Mar1) formation is very low just above the detection limits with levels that were ~100-fold lower than in the M2 cells. This made it not plausible to accurately assess a role for FLAP (using MK886) in SPM formation in M1 cells since they did not produce appreciable amounts of SPM. Importantly, the pro-resolving M2 cells expressed much higher 15-LOX-1 that can preferably produce SPM. The capacity to release AA, DHA, and EPA in response to *E. coli* was enhanced during polarization to M1 and M2. Thus, the differential LM production in M1 vs. M2 is likely not due to limitations in substrate release. Instead, strikingly higher 15-LOX-1 protein expression in M2 above that of the M1 cells appears to account for the greater SPM production by M2 cells. Whereas higher FLAP levels may support superior LTB<sub>4</sub> formation in M1 than SPM. Moreover, it is likely that subcellular substrate access for 5-LOX and/or 15-LOX-1 at different intracellular sites within the two macrophage phenotypes also contributes to the unique cell type-specific LM signature profiles they produce. Among SPM in self-resolving murine peritoneal *E. coli* infections, RvD5 is most abundant in the exudates<sup>6</sup>. Of note, RvD5 was the dominant SPM formed from *E. coli*-challenged human M2 macrophages. Here, RvD5 showed 100-fold higher amounts in M2 than in M1 cells and exceeding the amounts of LTB<sub>4</sub> produced by the M2 macrophages. These divergent LM signatures are in line with those reported for human macrophages during polarization and

after efferocytosis of apoptotic neutrophils<sup>9</sup>, and they are consistent with the well-appreciated pro-inflammatory role of the M1 macrophages and the functions of M2 in helping to orchestrate the resolution of inflammation and tissue repair<sup>8,20</sup>. Recently, in atherosclerosis imbalances between SPM and LT amounts were reported, where SPM levels in histologically defined stable regions of human carotid atherosclerotic plaques were higher than in vulnerable plaque regions<sup>21</sup>.

In line with the temporal LM production during bacterial infections in vivo<sup>6</sup>, pro-inflammatory LTB<sub>4</sub> and PGE<sub>2</sub> that promote phagocyte recruitment and edema in the early phase of inflammation were rapidly formed in *E. coli*-challenged macrophages, while SPM (e.g., RvD5) formation was delayed, congruent with the property to stimulate bacterial clearance during resolution of inflammation at later stages. Indeed, further support for this comes with the finding that RvD5 strongly enhanced phagocytosis of *E. coli* by M1 that abundantly express DRV1 as compared to LTB<sub>4</sub> and moderate BLT1 expression. This suggests that LTB<sub>4</sub> plays a crucial role in neutrophil chemotaxis at the initiation phase of inflammation<sup>22</sup>, and that RvD5 produced during the resolution phase functions as a major phagocytic signal for macrophages.

Despite the well-recognized fundamental and perpetual combat of macrophages with bacteria<sup>23,24</sup>, consequent induction of LM-SPM formation in bacteria-challenged human macrophages remained elusive. The present results show that the marked activation of LM pathways in human macrophages via pathogenic bacteria, a pathophysiological relevant condition, leads to pronounced LM levels from endogenous substrates. Results obtained with isolated primary human cells that addressed mechanistic questions on 5-LOX-mediated LM biosynthesis have applied exogenous agents that evoke almost immediate (within seconds)



## ARTICLE

NATURE COMMUNICATIONS | DOI: 10.1038/s41467-017-02538-5

robust cell activation such as  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore (i.e., A23187), fMLF, platelet-activating factor, or C5a<sup>14</sup>. Relevant microbes that markedly induce 15-LOX-1 product biosynthesis from endogenous substrates in isolated cells have not been reported earlier. Here, *E. coli* evoked significant higher LM levels in M2 as compared to serum-treated zymosan or LPS-fMLF, agents that are commonly used in studies investigating LM biosynthesis in macrophages. Surprisingly, pathogenicity was a requisite for LOX-dependent LM formation, while PG production was essentially equally produced in response to non-pathogenic or pathogenic bacteria. These new findings implicate divergent factors and activation mechanisms of LOX pathways. LPS, a membrane component of Gram-negative bacteria, potently activates macrophages for secretion of cytokines (e.g., TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), nitric oxide and pro-inflammatory LM via CD14 and TLR4<sup>25</sup>. Interestingly, activation of another TLR signaling route, i.e., TLR7 that recognizes viral ssRNA and damaged self-RNA, stimulated DHA-derived SPM production in macrophages and promoted resolution of airway inflammation<sup>26</sup>. In our present results, LPS (plus fMLF) did not mimic *E. coli*-induced SPM formation or translocation of 5-LOX or 15-LOX-1. These agonists LPS and fMLF mainly stimulated formation of PG in M1, the pattern observed for non-pathogenic bacteria. Phagocytosis-related activation is an unlikely explanation since cytochalasins B and D (inhibitors of phagocytosis) did not block *E. coli*-activated LM formation. Thus, PAMP recognition alone by human macrophages is not sufficient to stimulate the biosynthesis of SPM.

Upon cell activation, 5-LOX and 15-LOX-1 translocate from soluble to membranous compartments to receive substrate(s) for LM formation<sup>14,15</sup>. Apart from substrate utilization of AA, and EPA, we cannot fully explain all of the effects of MK886 on such complex LM networks. Some actions of MK886 may be off target in these cell types. Also, cPLA<sub>2</sub> (that releases AA and EPA) may participate within the 5-LOX/FLAP complex which is disrupted by MK886 and might thus negatively affect cPLA<sub>2</sub>. It is possible that LTB<sub>4</sub> or 5-HETE may act as autocrine enhancers for further AA and EPA release that would be abolished when MK886 blocks LTB<sub>4</sub> and 5-HETE biosynthesis. The subcellular localization and trafficking of 5-LOX or 15-LOX-1 in M1 and M2 was yet unknown. Here, our experiments revealed distinct subcellular distribution patterns of these LOXs in M1 and M2. These results demonstrate for the first time that bacteria causes 5-LOX nuclear translocation and interaction with FLAP. Unexpectedly, while 5-LOX moved to the nuclear envelope, 15-LOX-1 accumulated in the cytosol of M2 after *E. coli* challenge, excluding co-localization of 15-LOX-1 with 5-LOX and FLAP. The substrate supply at these different locales may vary, where 15-LOX-1 is preferentially provided with DHA in M2 cells and 5-LOX with AA in the M1 cells. RvD5 formation requires first 15-LOX-1-mediated DHA lipooxygenation to produce 17-H(p)DHA that is then converted by 5-LOX to RvD5<sup>3</sup>. The apparent lack of co-localization of these LOXs implies that the 15-LOX-1-formed 17-HDHA is effectively shuttled to 5-LOX, seemingly independent of FLAP as MK886 did not block RvD5 formation in the M2 cells. It is possible that in M2 macrophages the RvD5 is produced via 15-LOX-1 alone to insert both molecules of molecular oxygen without the need of 5-LOX or FLAP. Formation of the two precursors of RvD5 (7S,17S-diHDHA), namely 7S-HDHA and 17S-HDHA, was not directly inhibited by MK886 in M2 cells suggesting that the oxygenations at 7- and 17-positions in these cells from endogenous substrate leading to RvD5 appear to be 5-LOX/FLAP independent. Along these lines, 15-LOX-1 is able to catalyze all steps in the biosynthesis of LXA<sub>4</sub>, without the need of 5-LOX<sup>27</sup>. In this context, it was shown that activated cytoplasmic 5-LOX in macrophages, without access to FLAP favors SPM biosynthesis over the production of LTB<sub>4</sub><sup>28</sup>, suggesting a limited

role for FLAP in leukotriene biosynthesis. 5-LOX and 15-LOX-1 are known to require  $\text{Ca}^{2+}$  for membrane translocation and full enzymatic activity<sup>14,15</sup>. Pathogenic *E. coli* elevated  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in M1 and M2 positively correlating with  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent 5-LOX/15-LOX-1 translocation and LOX-mediated LM formation that contrasts the non-pathogenic bacteria.

Together, these results demonstrate that pathogenic bacteria are able to evoke the biosynthesis of specific LM profiles from endogenous substrates via activation of LOX pathways associated with macrophage phenotypes. Notably, these different LM signature profiles contribute to the functions of pro-inflammatory M1. These are distinct LM profiles than those from the pro-resolving M2 phenotype that produce specific SPM with pathophysiological relevant bacteria.

## Methods

**Cell isolation and polarization of macrophages.** Human monocytes were isolated from de-identified leukopacks obtained from Children's Hospital Blood Bank (Boston, MA) or the Institute of Transfusion Medicine, University Hospital Jena, Germany, with the use of Ficoll-Histopaque 1077-1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Blood was obtained from healthy human volunteers giving informed consent under protocol #1999-P-001297 approved by the Partners Human Research Committee. The protocols for experiments with macrophages were approved by the ethical commission of the Friedrich-Schiller-University Jena. All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. For differentiation and polarization towards M1 and M2, published criteria were used<sup>9</sup>. Briefly, M1 was produced by incubating isolated monocytes with GM-CSF (20 ng/ml) for 6 days in RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Grand Island, NY), 2 mmol/l L-glutamine (Lonza, Basel, Switzerland), and penicillin-streptomycin (Lonza), followed by LPS (100 ng/ml) plus INF- $\gamma$  (20 ng/ml) treatment for the indicated times (routinely 48 h). M2 was obtained by incubating monocytes with 20 ng/ml M-CSF for 6 days followed by polarization with 20 ng/ml IL-4 for the indicated times (routinely 48 h).

**Flow cytometry.** Fluorescent staining for flow cytometric analysis was performed in M1 or M2 in FACS buffer (PBS with 1% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide). Fc receptor-mediated non-specific antibody binding was blocked by using human TruStain FcX solution (Biolegend, San Diego, CA). Macrophages were stained for 30 min at 4 °C. The following antibodies were used: anti-human APC CD54 (HA58; Cat. no. 559771; 15  $\mu\text{l}/10^6$  cells in 100  $\mu\text{l}$ ), anti-human FITC CD206 (19.2; Cat. no. 551135; 10  $\mu\text{l}/10^6$  cells in 100  $\mu\text{l}$ ) (BD Bioscience, San Jose, CA), anti-human PE CD80 (2D10; Cat. no. 305208; 10  $\mu\text{l}/10^6$  cells in 100  $\mu\text{l}$ ), and anti-human PerCP/Cy5.5 CD163 (RM3/1; Cat. no. 326512; 15  $\mu\text{l}/10^6$  cells in 100  $\mu\text{l}$ ) (Biolegend, San Diego, CA). For surface expression of DRV1 and BLT1, polarized M1 and M2 were stained with PE anti-human BLT1 (203/14F11; Cat. no. 552836; 15  $\mu\text{l}/10^6$  cells in 100  $\mu\text{l}$ ; BD Bioscience) or rabbit anti-human DRV1 (GPR32) antibody (Cat. no. GTX108119; 2  $\mu\text{l}/10^6$  cells in 100  $\mu\text{l}$ ; GeneTex, Irvine, CA), followed by non-immune rabbit IgG for 30 min. Macrophages (M1 or M2) were analyzed using FACSCanto II (BD Bioscience) flow cytometer, and data analyzed using FlowJo X Software.

**Macrophage incubation and LM metabololipidomics.** Macrophages were routinely incubated at  $5 \times 10^6$  cells/ml of PBS with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS + Ca/Mg). In experiments where macrophages were treated in the presence of 0.5 mM EDTA and 20  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM, cells were incubated in PBS. Freshly grown pathogenic *E. coli* (serotype O6:K2:H1, except stated otherwise) or non-pathogenic *E. coli* JM-109 or *E. coli* BL21 strains were added at a ratio of 1:50 (macrophages:*E. coli*) and incubated at 37 °C for the indicated times. The supernatants were transferred to 2 ml of ice-cold methanol containing the deuterium-labeled internal standards d<sub>8</sub>-5S-HETE, d<sub>4</sub>-LTB<sub>4</sub>, d<sub>5</sub>-LXA<sub>4</sub>, d<sub>5</sub>-RvD2, and d<sub>4</sub>-PGE<sub>2</sub> (500 pg, each) to facilitate quantification and sample recovery. Samples were kept at -20 °C for 60 min to allow protein precipitation and then centrifuged (1200  $\times$  g, 4 °C, 10 min). Solid-phase C18 cartridges were equilibrated with 6 ml methanol before the addition of 6 ml H<sub>2</sub>O. Next, 9 ml acidified H<sub>2</sub>O (pH 3.5, HCl) was added to the samples, and loaded onto the conditioned C18 columns that were washed once with 6 ml H<sub>2</sub>O, followed by 6 ml hexane. The products were eluted with 6 ml of methyl formate. Samples were brought to dryness using an evaporation system (TurboVap LV, Biotage) and immediately suspended in methanol-water (50/50 vol/vol) for LC-MS-MS automated injections.

The LC-MS-MS system employed was equipped with a Shimadzu LC-20AD HPLC and a Shimadzu SIL-20AC autoinjector (Shimadzu, Kyoto, Japan), coupled with a QTrap 5500 (ABSciex, Framingham, MA). An Eclipse Plus C18 column (100  $\times$  4.6 mm  $\times$  1.8  $\mu\text{m}$ ; Agilent) was kept in a column oven maintained at 50 °C (ThermoSphere TS-130; Phenomenex, Torrance, CA), and LM were eluted with a mobile phase consisting of methanol-water-acetic acid of 55:45:0.01 (vol/vol/vol)

that was ramped to 85:15:0.01 (vol/vol/vol) over 10 min and then to 98:2:0.01 (vol/vol/vol) for the next 8 min. This was subsequently maintained at 98:2:0.01 (vol/vol/vol) for 2 min, and the flow rate was maintained at 0.4 ml/min. The QTrap 5500 was operated in negative ionization mode using scheduled MRM coupled with information-dependent acquisition (IDA) and an enhanced product ion scan. The scheduled MRM window was 90 s, and each LM parameter was optimized individually.

To monitor each LM and their respective pathways, an MRM method was used with diagnostic ion fragments and identification using recently published criteria<sup>9</sup>, including matching RT to synthetic and authentic materials and at least six diagnostic ions for each LM. Calibration curves were obtained for each using authentic compound mixtures and deuterium-labeled LM at 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, and 200 pg (e.g., d<sub>8</sub>-5S-HETE, d<sub>4</sub>-LTB<sub>4</sub>, d<sub>5</sub>-LXA<sub>4</sub>, and d<sub>5</sub>-RvD<sub>2</sub>). Linear calibration curves were obtained for each LM, which gave  $r^2$  values of 0.98–0.99. Internal standard recoveries, interference of the matrix, and limit of detection (range of 20–220 fg for the QTrap 5500 in tissue and in biological matrix) were determined.

**Principal component analysis.** PCA was performed using SIMCA 13.0.3 software (MKS Data Analytics Solution Umea, Sweden) following mean centering and unit variance scaling of LM amounts. PCA serves as an unbiased, multivariate projection designed to identify the systematic variation in a data matrix (the overall bioactive LM profile of each sample) with lower dimensional plane using score plots and loading plots. The score plot shows the systematic clusters among the observations (closer plots presenting higher similarity in the data matrix). Loading plots describe the magnitude and the manner (positive or negative correlation) in which the measured LM/SPM contribute to the cluster separation in the score plot.

**SDS-PAGE and western blot.** Cell lysates of macrophages, corresponding to  $3 \times 10^6$  cells, were separated on 10% (5-LOX, 15-LOX-1) and 16% (FLAP) polyacrylamide gels, and blotted onto nitrocellulose membranes (Hybond ECL, GE Healthcare, Freiburg, Germany). The membranes were incubated with the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-15-LOX-1, 1:500 (ab119774, Abcam, Cambridge, UK); rabbit polyclonal anti-5-LOX, 1:500 (1550 AK6, provided by Dr. Olof Radmark, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden); rabbit polyclonal anti-FLAP, 0.1 µg/ml (ab85227, Abcam, Cambridge, UK); rabbit anti-β-actin, 1:1000 (4967S, Cell Signaling, Danvers, MA). Immunoreactive bands were stained with IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG (H + L), 1:10,000 (926-3221, LI-COR Biotechnology, Cambridge, UK) and/or IRDye 680LT Goat anti-Rabbit IgG (H + L), 1:40,000 (926-68023, LI-COR Biotechnology, Cambridge, UK), and visualized by an Odyssey infrared imager (LI-COR Biosciences). Data from densitometric analysis were background corrected.

**Immunofluorescence microscopy.** M1 and M2 ( $1 \times 10^6$  cells) were seeded onto glass coverslips in a 12-well plate and cultured for 48 h. *E. coli* (ratio 1:50, macrophages: *E. coli*) or vehicle (PBS) was added at 37 °C and stopped after the indicated times by fixation with 4% paraformaldehyde solution. Acetone (3 min, 4 °C) followed by 0.25% Triton X-100 for 10 min at RT was used for permeabilization before blocking with normal goat serum 10% (50062Z, ThermoFisher). Samples were incubated with mouse monoclonal anti-5-LOX antibody, 1:100 (6A12 AB, 250 µg/ml; kindly provided by Dr. Dieter Steinhilber, Goethe-University-Frankfurt, Frankfurt, Germany)<sup>16</sup> and rabbit polyclonal anti-FLAP antibody, 5 µg/ml (ab85227, Abcam, Cambridge, UK Abcam), or mouse monoclonal anti-15-LOX-1 antibody, 1:100 (ab119774, Abcam, Cambridge, UK) and rabbit anti-5-LOX antibody, 1:100 (1550 AK6, kindly provided by Dr. Olof Radmark, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden) at 4 °C overnight. 5-LOX, 15-LOX-1, and FLAP were stained with the fluorophore-labeled secondary antibodies; Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H + L), 1:500 (A11034, ThermoFisher) and Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG (H + L), 1:500 (A21424, ThermoFisher). Nuclear DNA was stained with ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (15395816, ThermoFisher). Samples were analyzed by a Zeiss Axiovert 200M microscope, and a Plan Neofluar ×40/1.30 Oil (DIC III) objective (Carl Zeiss, Jena, Germany). An AxioCam MR camera (Carl Zeiss) was used for image acquisition.

**Proximity ligation assay.** To detect in situ interaction of 5-LOX with FLAP in M1 and M2, an in situ PLA was performed as described<sup>16</sup>. Briefly, cells were treated, fixed, and incubated with the primary antibodies as described for immunofluorescence microscopy. The cells were incubated with species-specific secondary antibodies conjugated with oligonucleotides (Duolink In Situ PLA probe anti-mouse MINUS, DUO92004 and anti-rabbit PLUS, DUO92002, Sigma, Taufkirchen, Germany) for 1 h at 37 °C. By addition of two other circle-forming DNA oligonucleotides and a ligase (30 min at 37 °C), the antibody-bound oligonucleotides form a DNA circle when the target proteins are < 40 nm distant from each other. The newly generated DNA circle was amplified by rolling circle amplification and visualized by hybridization with fluorescently labeled oligonucleotides (Duolink In Situ Detection Reagents FarRed, DUO92013, Sigma, Taufkirchen, Germany). Nuclear DNA was stained with DAPI. The PLA interaction signal appears as a fluorescent spot (magenta) and was analyzed by fluorescence

microscopy using a Zeiss Axiovert 200M microscope, and a Plan Neofluar ×40/1.30 Oil (DIC III) objective (Carl Zeiss, Jena, Germany).

**Ca<sup>2+</sup> imaging.** Adherent M1 and M2 ( $5 \times 10^6$  cells) were pre-stained with Fura-2/AM (2 µM) for 45 min at 37 °C in the dark. After two washing steps, cells were resuspended in PG-BSA buffer (PBS, 0.1% glucose, 0.1% fatty acid-free BSA) at a density of  $1.25 \times 10^6$ /ml. In total, 200 µl of the cell suspension were transferred into a 96-well plate and 1 mM CaCl<sub>2</sub> was added. After 10 min, 1 µM fMLF, 2 µM ionomycin, *E. coli* (macrophages: *E. coli* = 1:50) or vehicle (PG-BSA) was added. The signal was monitored in a thermally (37 °C) controlled NOVostar microplate reader (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Germany; emission at 510 nm, excitation at 340 nm (Ca<sup>2+</sup>-bound Fura-2) and 380 nm (free Fura-2)). After cell lysis with Triton X-100, the maximal fluorescence signals were monitored, and after chelating Ca<sup>2+</sup> with 20 mM EDTA, the minimal fluorescence signals were recorded. The ratio of signals obtained with Triton X-100 subtracted by the signals obtained at basal fluorescence intensity (shown as Δratio) of each experiment was set to 100%.

**Real-time imaging of phagocytosis by human macrophages.** M1 or M2 (50,000 cells/well in PBS + Ca/Mg) was plated onto 8-well chamber slides. Chamber slides were kept in a Stage Top Incubation system for microscopes equipped with a built-in digital gas mixer and temperature regulator (TOKAI HIT model INUF-K14). RvD5 or LTB<sub>4</sub> (10 nM) was added to the cells for 15 min, followed by addition of BacLight Green-labeled *E. coli* (macrophage: *E. coli* ratio = 1:50). Images were then acquired every 10 min for 3 h (37 °C) with Keyence BZ-9000 (BIOREVO) inverted fluorescence phase-contrast microscope (×20 objective) equipped with a monochrome/color switching camera using BZ-II Viewer software (Keyence, Itasca, IL, USA). Green fluorescence intensity was quantified using BZ-II Analyzer.

**Statistical analyses.** The sample size for experiments was chosen empirically based on previous studies to ensure adequate statistical power. Results are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.) of  $n$  observations, where  $n$  represents the number of experiments with cells from separate donors, performed on different days, as indicated. Analyses of data were conducted using GraphPad Prism 7 software (San Diego, CA). Two-tailed  $t$  test was used for comparison of two groups. For multiple comparison, one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni or Dunnett's post hoc tests were applied. The criterion for statistical significance is  $P < 0.05$ . PCA was carried out using SIMCA 13.0.3 software (MKS Data Analysis Solutions).

**Data availability.** The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon request.

Received: 19 April 2017 Accepted: 7 December 2017

Published online: 04 January 2018

## References

- Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**, 1191–1197 (2005).
- Haeggstrom, J. Z. & Funk, C. D. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem. Rev.* **111**, 5866–5898 (2011).
- Serhan, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* **510**, 92–101 (2014).
- Calder, P. C. n-3 Fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *Proc. Nutr. Soc.* **72**, 326–336 (2013).
- Tabas, I. & Glass, C. K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* **339**, 166–172 (2013).
- Chiang, N. et al. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature* **484**, 524–528 (2012).
- Lee, C. R. & Zeldin, D. C. Resolvin infectious inflammation by targeting the host response. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2183–2185 (2015).
- Motwani, M. P. & Gilroy, D. W. Macrophage development and polarization in chronic inflammation. *Sem. Immunol.* **27**, 257–266 (2015).
- Dalli, J. & Serhan, C. N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* **120**, e60–e72 (2012).
- Murray, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
- Colas, R. A., Shinohara, M., Dalli, J., Chiang, N. & Serhan, C. N. Identification and signature profiles for pro-resolving and inflammatory lipid mediators in human tissue. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **307**, C39–C54 (2014).
- Hsueh, W., Gonzalez-Crussi, F. & Hanneman, E. Prostaglandin synthesis in different phases of phagocytosis in lung macrophages. *Nature* **283**, 80–82 (1980).

## ARTICLE

NATURE COMMUNICATIONS | DOI: 10.1038/s41467-017-02538-5

13. Bafica, A. et al. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J. Clin. Investig.* **115**, 1601–1606 (2005).
14. Radmark, O., Werz, O., Steinhilber, D. & Samuelsson, B. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 331–339 (2015).
15. Brinckmann, R. et al. Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme. *Blood* **91**, 64–74 (1998).
16. Gerstmeier, J. et al. Time-resolved in situ assembly of the leukotriene-synthetic 5-lipoxygenase/5-lipoxygenase-activating protein complex in blood leukocytes. *FASEB J.* **30**, 276–285 (2016).
17. Serhan, C. N. et al. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J. Exp. Med.* **206**, 15–23 (2009).
18. Deng, B. et al. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. *PLoS ONE* **9**, e102362 (2014).
19. Serhan, C. N. et al. Anti-Inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J. Immunol.* **176**, 1848–1859 (2006).
20. Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A. & Locati, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* **229**, 176–185 (2013).
21. Fredman, G. et al. An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques. *Nat. Commun.* **7**, 12859 (2016).
22. Lammermann, T. et al. Neutrophil swarms require LTB<sub>4</sub> and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature* **498**, 371–375 (2013).
23. Ginhoux, F. Fate PPAR-tioning: PPAR-gamma 'instructs' alveolar macrophage development. *Nat. Immunol.* **15**, 1005–1007 (2014).
24. Glass, C. K. & Natoli, G. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat. Immunol.* **17**, 26–33 (2016).
25. Morris, M. C., Gilliam, E. A. & Li, L. Innate immune programming by endotoxin and its pathological consequences. *Front. Immunol.* **5**, 680 (2015).
26. Konsolita, O. et al. Toll-like receptor 7 stimulates production of specialized pro-resolving lipid mediators and promotes resolution of airway inflammation. *EMBO Mol. Med.* **5**, 762–775 (2013).
27. Serhan, C. N. et al. Lipoxin A. Stereochemistry and biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **261**, 16340–16345 (1986).
28. Fredman, G. et al. Resolvin D1 limits 5-lipoxygenase nuclear localization and leukotriene B<sub>4</sub> synthesis by inhibiting a calcium-activated kinase pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 14530–14535 (2014).

**Acknowledgements**

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB1127, Chem-BioSys) and in part by Grants from National Institutes of Health (NIH) NIGMS P01GM095467. J.G. received a Carl-Zeiss stipend. These studies were initiated with O.W. while on sabbatical in the C.N.S. laboratory, Boston.

**Author contributions**

O.W., J.G., S.L., X.D.L.R., and N.C. performed these experiments; O.W., J.G., S.L., X.D.L.R., M.W., N.C., and P.C.N. performed analyses; O.W. and C.N.S. designed the study, and all authors contributed to manuscript preparation.

**Additional information**

**Supplementary Information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02538-5>.

**Competing interests:** C.N.S. declares he is an inventor on patents [resolvins] assigned to Brigham and Women's Hospital and licensed for clinical development by Brigham and Women's Hospital and Partners Health Care reviewed in accordance with their conflict of interest policies. The remaining authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

## 3.2 Manuskript II

---

### Targeting biosynthetic networks of the proinflammatory and proresolving lipid metabolome

Markus Werner<sup>\*</sup>, Paul M. Jordan, Erik Romp, Anna Czapka, Zhigang Rao, Christian Kretzer, Andreas Koeberle, Ulrike Garscha, Simona Pace, Hans-Erik Claesson, Charles N. Serhan, Oliver Werz, and Jana Gerstmeier

**FASEB Journal**, 2019. 33(5): p. 6140-6153

---

Für diese Studie wurde eine umfassende UPLC-MS/MS basierte Lipidmediator (LM)-Analytik etabliert. Durch Stimulierung von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Makrophagen mit *E. coli* (O6:K2:H1) konnten wir komplexe LM-Profile erstellen. Wir untersuchten, wie bekannte pharmakologische Substanzen über ihre postulierte Wirkweise hinaus diese LM-Fingerabdrücke modulieren. Neben der erwarteten Inhibition ihres Zielenzymes, beobachteten wir, dass: (I) die Inhibitoren von COX und 15-LO-1 gleichzeitig die Konzentration proinflammatorischer Leukotriene erhöhen; (II) die Leukotrienhemmung der Inhibitoren von 5-LO und seinem Helferprotein FLAP in M1 stärker ausgeprägt ist als in M2; (III) der klinisch zugelassene 5-LO-Inhibitor (Zileuton) auch die Bildung von 15-LO-Produkten, inklusive SPM blockiert - aber der FLAP-Inhibitor zusätzlich in erhöhten, vor allem DHA-abgeleiteten, SPM mündete; (IV) der 15-LO-1 Inhibitor 3887 die Produktbildung sämtlicher SPM in M2 blockiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass vermeintlich spezifische Modulatoren von Enzymen der LM-Biosynthese das Gesamtnetzwerk unerwartet stark verändern und damit die Pharmakotherapie entzündlicher Erkrankungen mehr oder weniger wünschenswert beeinflussen können.

**Eigenanteil:** Etablierung der UPLC-MS/MS-Analytik. Zellkultur: Generierung von M1 und M2. Experimentelles Design und Durchführung der Mehrzahl der Inhibitorstudien. Erstellung der Korrelationsanalysen. Datenanalyse und Mitwirken bei der Manuskripterstellung.

**Relativer Gesamtanteil: 70%**



## Targeting biosynthetic networks of the proinflammatory and proresolving lipid metabolome

Markus Werner,\* Paul M. Jordan,\* Erik Romp,\* Anna Czapka,\* Zhigang Rao,\* Christian Kretzer,\*  
Andreas Koeberle,\* Ulrike Garscha,\* Simona Pace,\* Hans-Erik Claesson,<sup>†</sup> Charles N. Serhan,<sup>‡</sup> Oliver Werz,<sup>\*,1</sup>  
and Jana Gerstmeier<sup>\*,2</sup>

\*Department of Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Friedrich Schiller University Jena, Jena, Germany; <sup>†</sup>Division of Hematology, Department of Medicine, Karolinska University Hospital Solna, Stockholm, Sweden; and <sup>‡</sup>Department of Anesthesia, Perioperative and Pain Medicine, Center for Experimental Therapeutics and Reperfusion Injury, Brigham and Women's Hospital-Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

**ABSTRACT:** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs interfere with the metabolism of arachidonic acid to proinflammatory prostaglandins and leukotrienes by targeting cyclooxygenases (COXs), 5-lipoxygenase (LOX), or the 5-LOX-activating protein (FLAP). These and related enzymes act in conjunction with marked crosstalk within a complex lipid mediator (LM) network where also specialized proresolving LMs (SPMs) are formed. Here, we present how prominent LM pathways can be differentially modulated in human proinflammatory M1 and proresolving M2 macrophage phenotypes that, upon exposure to *Escherichia coli*, produce either abundant prostaglandins and leukotrienes (M1) or SPMs (M2). Targeted liquid chromatography–tandem mass spectrometry–based metabololipidomics was applied to analyze and quantify the specific LM profiles. Besides expected on-target actions, we found that: 1) COX or 15-LOX-1 inhibitors elevate inflammatory leukotriene levels, 2) FLAP and 5-LOX inhibitors reduce leukotrienes in M1 but less so in M2 macrophages, 3) zileuton blocks resolution-initiating SPM biosynthesis, whereas FLAP inhibition increases SPM levels, and 4) that the 15-LOX-1 inhibitor 3887 suppresses SPM formation in M2 macrophages. Conclusively, interference with discrete LM biosynthetic enzymes in different macrophage phenotypes considerably affects the LM metabolomes with potential consequences for inflammation-resolution pharmacotherapy. Our data may allow better appraisal of the therapeutic potential of these drugs to intervene with inflammatory disorders.—Werner, M., Jordan, P. M., Romp, E., Czapka, A., Rao, Z., Kretzer, C., Koeberle, A., Garscha, U., Pace, S., Claesson, H.-E., Serhan, C. N., Werz, O., Gerstmeier, J. Targeting biosynthetic networks of the proinflammatory and proresolving lipid metabolome. *FASEB J.* 33, 6140–6153 (2019). www.fasebj.org

**KEY WORDS:** resolution · macrophages · inflammation · leukotrienes · prostaglandins

Arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA) are precursor substrates for lipoxygenases (LOXs) and cyclooxygenases (COXs) that

initiate the biosynthesis of potent bioactive lipid mediators (LMs) that regulate the initiation and resolution of inflammation (1, 2). Unresolved, chronic inflammation with elevated levels of proinflammatory prostaglandins (PGs) and leukotrienes (LTs) contributes to numerous widespread diseases, including arthritis, atherosclerosis and cardiovascular diseases, type 2 diabetes, asthma, and Alzheimer's disease that require therapeutic targeting of the inflammatory process and its resolution (3, 4). For pharmacological intervention with chronic inflammation, drugs that block the formation of PGs and LTs by inhibition of COX-1/2 and 5-LOX or 5-LOX-activating protein (FLAP), respectively, are commonly used (5, 6). Specifically, the so-called nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, e.g., ibuprofen) that inhibit PG formation provoke their beneficial effects mainly by alleviating pain and by blocking acute inflammation (5) but are essentially inefficient at terminating inflammation or in promoting resolution and tissue repair.

A novel superfamily of LMs that are called specialized proresolving mediators (SPMs), including lipoxins (LXs),

**ABBREVIATIONS:** AA, arachidonic acid; COX, cyclooxygenase; cPLA<sub>2</sub>, cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; FLAP, 5-LOX-activating protein; HDHA, hydroxy DHA; HEPE, hydroxyeicosapentaenoic acid; HETE, hydroxyeicosatetraenoic acid; LM, lipid mediator; LOX, lipoxygenase; LT, leukotriene; LX, lipoxin; MaR, maresin; MRM, multiple reaction monitoring; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; PD, protectin; PG, prostaglandin; pg, picogram; Rv, resolvin; SPM, specialized proresolving mediator; UPLC-MS-MS, ultraperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry

<sup>1</sup> Correspondence: Department of Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Friedrich Schiller University Jena, Philosophenweg 14, Jena 07743, Germany. E-mail: oliver.werz@uni-jena.de

<sup>2</sup> Correspondence: Department of Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Friedrich Schiller University Jena, Philosophenweg 14, Jena 07743, Germany. E-mail: jana.gerstmeier@uni-jena.de

doi: 10.1096/fj.201802509R

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

resolvins (Rvs), maresins (MaRs), and protectins (PDs), that actively terminate inflammation and promote tissue regeneration are biosynthesized by COX and LOX pathways as well (Fig. 1A) (2, 7, 8). Thus, COX and 5-LOX pathway inhibitors may interfere with beneficial SPM formation too. Moreover, NSAIDs are frequently associated with adverse on-target side effects by suppressing homeostatic prostanoids (5) and by redirecting LM biosynthesis toward proinflammatory LTs (9). The 15-LOX-1 appears to be involved in inflammation in the respiratory tract (10, 11) but also in the formation of SPM, particularly in anti-inflammatory macrophage phenotypes (12).

LM biosynthesis inhibitors (including NSAIDs) have been evaluated in cell-based studies with limited read-out, mainly addressing inflammation-promoting PGs and LTs in proinflammatory immune cells (*i.e.*, neutrophils, monocytes, and M1-like macrophages), whereas SPMs have not yet been essentially studied because they are the newest mediators uncovered with novel proresolving functions (7, 13). Thus, modulation of SPM biosynthesis by COX and LOX inhibitors and other potential anti-inflammatory drugs on the cellular level is elusive. Moreover, because LM biosynthesis is organized within connected cascades that can crosstalk, pharmacological interference with one pathway may redirect toward other LM routes within competent cells (9, 14, 15).

Macrophages are innate immune cells that are crucial for initiation, maintenance, and resolution of inflammation depending on their phenotypes, namely, proinflammatory M1-like and proresolving, anti-inflammatory M2-like subtypes (16). Human M1 and M2 macrophages exposed to pathogenic bacteria produce differential LMs that distinguish their inflammatory or proresolving phenotypes: M1-like mainly generate 5-LOX- and COX-2-derived PGs and LTs, whereas M2-like produce predominantly 15-LOX-derived SPMs, including LX, Rv, PD, and MaR1 (12). Such bacteria-stimulated human macrophage phenotypes represent a pathophysiologically relevant, cell-based approach that enables the assessment of a broad spectrum of bioactive LMs by metabololipidomics. Therefore, we made use of this convenient experimental system for a comprehensive analysis of LM pathway inhibitors to reveal their ability to affect the complex network of proinflammatory and proresolving LMs.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell isolation and polarization of macrophages

Leukocyte concentrates from freshly withdrawn peripheral blood of healthy adult human donors were provided by the Institute of Transfusion Medicine, Jena University Hospital (Jena, Germany). The experimental protocol was approved by the ethical committee of the Jena University Hospital. All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. Peripheral blood mononuclear cells were isolated using dextran sedimentation and Ficoll-Histopaque 1077-1 (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) centrifugation. For differentiation and polarization toward M1 and M2 macrophages, criteria published by Werz *et al.* (12) were used. Thus, M1 macrophages were generated by incubating monocytes with 20 ng/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) for 6 d in Roswell Park Memorial Institute

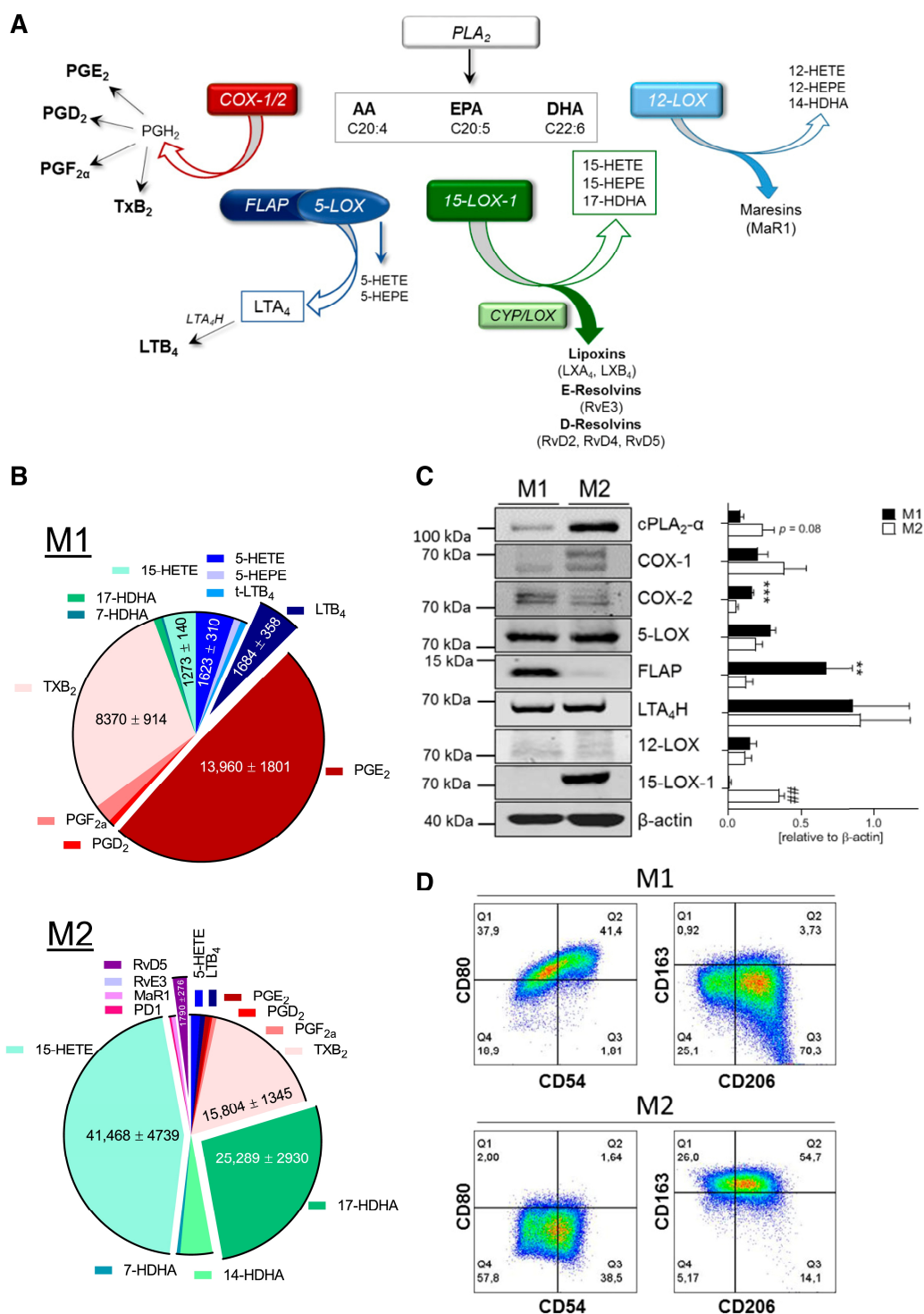
medium 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM *l*-glutamine (Merck, Kenilworth, NJ, USA), and penicillin-streptomycin (Merck), followed by 100 ng/ml LPS (MilliporeSigma) and 20 ng/ml INF- $\gamma$  (Peprotech) treatment for another 48 h. M2 macrophages were incubated with 20 ng/ml M-CSF (Peprotech) for 6 d of differentiation plus 20 ng/ml IL-4 (Peprotech) for an additional 48 h of polarization.

### Incubations of macrophages and LM metabololipidomics

Macrophages ( $2 \times 10^6$ /ml) were incubated in PBS containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Compounds or vehicle control (0.1% DMSO) were applied 15 min prior to stimulation with *E. coli* (serotype O6:K2: H1) at a ratio of 1:50 (M1/M2:*E. coli*) for 180 min at 37 °C. The 15-LOX-1 inhibitor 3887 was synthesized as described by Han *et al.* (17). Ibuprofen and celecoxib were purchased from MilliporeSigma, MK886 from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA), zileuton from Sequoia Research Products (Pangbourne, United Kingdom), and RSC-3388 from Merck. Supernatants were transferred to 2 ml of ice-cold methanol containing 10  $\mu$ l of deuterium-labeled internal standards [200 nM d<sub>8</sub>-5S-hydroxyecosatetraenoic acid (HETE), d<sub>4</sub>-LTB<sub>4</sub>, d<sub>5</sub>-LXA<sub>4</sub>, d<sub>5</sub>-RvD<sub>2</sub>, d<sub>4</sub>-PGE<sub>2</sub> and 10  $\mu$ M d<sub>8</sub>-AA] to facilitate quantification. Deuterated and nondeuterated LM standards were purchased from Cayman Chemicals. Sample preparation was conducted by adapting criteria published by Colas *et al.* (18). In brief, samples were kept at -20 °C for 60 min to allow protein precipitation. After centrifugation (1200 g, 4 °C, 10 min), 8 ml acidified H<sub>2</sub>O (pH 3.5) was added and subjected to solid phase extraction (SPE). Solid phase cartridges (Sep-Pak Vac 6cc 500 mg/6 ml C18; Waters, Milford, MA, USA) were equilibrated with 6 ml methanol and 2 ml H<sub>2</sub>O before samples were loaded onto columns. After washing with 6 ml H<sub>2</sub>O and an additional 6 ml *n*-hexane, LMs were eluted with 6 ml methyl formate. Finally, the samples were brought to dryness using an evaporation system (TurboVap LV; Biotage, Uppsala, Sweden) and resuspended in 100  $\mu$ l methanol water (50/50, v/v) for ultraperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS) automated injections. LM profiling was analyzed with an Acquity UPLC system (Waters) and a QTrap 5500 Mass Spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA) equipped with a Turbo V Source and electrospray ionization. LMs were eluted using an Acquity UPLC BEH C18 column (1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  100 mm; Waters) at 50 °C with a flow rate of 0.3 ml/min and a mobile phase consisting of methanol, water, and acetic acid at a ratio of 42:58:0.01 (v/v/v) that was ramped to 86:14:0.01 (v/v/v) over 12.5 min and then to 98:2:0.01 (v/v/v) for 3 min (Supplemental Table S1). The QTrap 5500 was operated in negative-ionization mode using scheduled multiple reaction monitoring (MRM) coupled with information-dependent acquisition. The scheduled MRM window was 60 s, optimized LM parameters (CE; Collision Energy, EP; Entrance Potential, DP; Declustering Potential, CXP; Collision Cell Exit Potential) were adopted (19), and the curtain gas pressure was set to 35 psi. The retention time and at least 6 diagnostic ions for each LM were confirmed by means of an external standard (Cayman Chemicals). Quantification was achieved by calibration curves for each LM. Linear calibration curves were obtained for each LM and gave *r*<sup>2</sup> values of 0.998 or higher (for fatty acids, 0.95 or higher). Additionally, the limit of detection for each targeted LM was determined (Supplemental Table S3).

### LM coregulation network analysis

LM circular correlation network was generated with the Cytoscape 3.6.0. software. In brief, percentage changes *vs.* vehicle control (100%) for each LM obtained by treatment with ibuprofen, celecoxib, indomethacin, diflupolol [kind gift by Dr. Barbara



**Figure 1.** LM biosynthetic pathways in human M1 and M2 macrophages. **A)** Schematic overview on the bioactive eicosanoid and docosanoid pathways in inflammation and resolution. **B)** LM profiles of M1 and M2 macrophages upon exposure to pathogenic *E. coli*. Human monocyte-derived macrophages were polarized for 48 h to M1 and M2 ( $2 \times 10^6$  cells/ml) and incubated for 180 min with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50) at 37 °C. Formed LMs were isolated by SPE and analyzed by UPLC-MS-MS, shown as a pie chart. Values are means  $\pm$  SEM of  $n = 24-34$  for M1 and  $n = 33-39$  for M2. **C)** Protein expression of LM biosynthetic enzymes and  $\beta$ -actin by Western blot and densitometric analysis thereof;  $n = 5$ . Data were log-transformed for paired Student's *t* test; M1 vs. M2. \*\* $P=0.01$ , \*\*\* $P=0.001$ , ## $P=0.01$ . **D)** Expression of surface polarization markers for M1 (CD54, CD80) and M2 (CD206, CD163), polarized for 48 h, was analyzed by flow cytometry, and representative histograms are shown from 3 independent experiments with separate donors.



Matuszczak (University of Innsbruck, Innsbruck, Austria)], zileuton, MK886, 3887, and RSC-3388 were determined in M1 and M2 macrophages. With these values, a Bravais-Pearson correlation was performed to enlighten positively correlated LM species with a correlation coefficient of 0.7 or higher. Coregulated LM species appear in close proximity to each other, forming specific clusters where the distance and connection lines visualize their proximity. The size of nodes reflects the LM abundance (in picograms) of DMSO controls produced from  $2 \times 10^6$  macrophages.

### SDS-PAGE and Western blot

Cell lysates of macrophages ( $2 \times 10^6$  cells) were separated on 8% [cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)-α], 10% (5-LOX, 12-LOX, 15-LOX-1, COX-1, COX-2, and LTA<sub>4</sub>H), and 16% (FLAP) polyacrylamide gels and blotted onto nitrocellulose membranes (Amersham Protran Supported 0.45 μm nitrocellulose; GE Healthcare, Chicago, IL, USA). The membranes were incubated with the following primary antibodies: polyclonal rabbit anti-cPLA<sub>2</sub>α, 1:200 (2832; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); rabbit polyclonal anti-5-LOX, 1:1000 (by Genscript, Piscataway, NJ, USA, to a peptide with the C-terminal 12 aa of 5-LOX: CSPDRIPNSVA; kindly provided by Dr. Marcia Newcomer, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA); polyclonal rabbit anti-12-LOX, 1:200 (NBP2-29941; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA); mouse monoclonal anti-15-LOX-1, 1:500 (ab119774; Abcam, Cambridge, United Kingdom); rabbit polyclonal anti-COX-1, 1:500 (4841; Cell Signaling Technology); rabbit polyclonal anti-COX-2, 1:500 (4842; Cell Signaling Technology); rabbit polyclonal anti-LTA<sub>4</sub>H, 1:1000 (ab133512; Abcam); rabbit polyclonal anti-FLAP, 0.1 μg/ml (ab85227; Abcam); and rabbit polyclonal anti-β-actin, 1:1000 (4967S; Cell Signaling Technology). Immunoreactive bands were stained with IRDye 800CW goat anti-mouse IgG (H+L), 1:10,000 (926-32210; Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA), IRDye 800CW goat anti-rabbit IgG (H+L), 1:15,000 (926-32211; Li-Cor Biosciences) and IRDye 680LT goat anti-mouse IgG (H+L), 1:40,000 (926-68020; Li-Cor Biosciences), and visualized by an Odyssey infrared imager (Li-Cor Biosciences). Data from densitometric analysis were background corrected.

### Flow cytometry

Fluorescent staining for flow cytometric analysis of M1 or M2 macrophages after 48 h polarization was performed in flow cytometry buffer (PBS with 0.5% bovine serum albumin, 2 mM EDTA, and 0.1% sodium azide). Nonspecific antibody binding was blocked using mouse serum for 10 min at 4°C prior to antibody staining. Subsequently, macrophages were stained with fluorochrome-labeled antibody mixtures at 4°C for 30 min. The following antibodies were used: FITC anti-human CD14 (2 μg/test, clone M5E2), PE anti-human CD54 (1 μg/test, clone HA58), APC-H7 anti-human CD80 (0.25 μg/test, clone L307.4; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), PE-Cy7 anti-human CD163 (2 μg/test, clone RM3/1; BioLegend, San Diego, CA, USA), PerCP-eFluor710 anti-human CD206 (0.06 μg/test, clone 19.2; BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Upon staining, M1 or M2 macrophages were analyzed using a Canto Plus flow cytometer (BD Biosciences), and data were analyzed using FlowJo X Software (BD Biosciences).

### Statistical analysis

The sample size for experiments was chosen empirically based on previous studies (12, 20) to ensure adequate statistical power. Results are expressed as means  $\pm$  SEM of  $n$  observations, where  $n$  represents the number of experiments with cells from separate donors and performed on different days in simplices, as

indicated. For the different treatments of cells with compounds, experiments were performed with  $n \geq 5$  unless otherwise mentioned; for some experiments,  $n < 5$  but  $\geq 3$  where highly consistent results were obtained. Analysis of data was conducted using Prism 7 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Data were log-transformed to generate stronger Gaussian-distributed data sets amenable to parametric analysis. A paired Student's  $t$  test was used for comparison between 2 groups. The criterion for statistical significance is a value of  $P < 0.05$ . The Bravais-Pearson correlation was analyzed with Microsoft Excel 2016 (Redmond, WA, USA) and Cytoscape 3.6.0 software (<https://cytoscape.org/>).

## RESULTS

### Differential bioactive LM pathways in human M1 and M2 macrophage phenotypes

Proinflammatory M1-like macrophages were obtained by differentiation of human peripheral blood monocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (6 d) and 48 h polarization with LPS plus INF-γ, whereas anti-inflammatory M2-like cells were made from monocytes by macrophage colony-stimulating factor-induced differentiation (6 d) followed by 48 h treatment with IL-4 (21). Metabololipidomics was applied to monitor broad-spectrum LM profiles of M1 and M2 macrophages. Adapting criteria published by Dalli and Serhan (19) for LM detection and quantitative analysis, we established a targeted lipidomics approach based on UPLC-MS-MS (Supplemental Tables S1–S3). This method allows simultaneous profiling and high-throughput (16 min) quantitative analysis of 33 LMs from M1 and M2 macrophages, identified based on published criteria (e.g., matching fragmentation patterns and 6 characteristic diagnostic ions) by Colas *et al.* (18). UPLC-specific retention time and separation of each LM was validated by chemical standards (Supplemental Table S3), and signature ion pairs obtained *via* MRM were used for quantification (18).

The phenotype-specific LM profiles of *E. coli*-challenged M1 and M2 macrophages (ratio 1:50; M1/M2: *E. coli*, 180 min) is reported in Fig. 1B and Supplemental Table S4; a comprehensive overview of the investigated LM pathways is shown in Fig. 1A. In agreement with the overall superior fatty acid substrate release (Supplemental Table S4) in M2 macrophages, the protein level of cPLA<sub>2</sub>α was higher than that in M1 macrophages (Fig. 1C). The marked differences in the LM metabolome (Fig. 1B) is a consequence of the distinct expression pattern of LM biosynthetic enzymes in M1 *vs.* M2 macrophages (Fig. 1C). The M1 phenotype generated predominantly 5-LOX-related LTs and COX-related PGs as well as 11-HEPE and 11-HEPE from AA and EPA, respectively, surpassing the respective capacities of M2 macrophages. Although 5-LOX and LTA<sub>4</sub>H were equally expressed in both phenotypes, FLAP dominated in M1 macrophages (Fig. 1C), presumably accounting for higher LTB<sub>4</sub> levels. Consequent to higher COX-2 expression, PGE<sub>2</sub> biosynthesis was more than 20-fold higher in M1 *vs.* M2 cells, whereas the expression of COX-1 and formation of TXB<sub>2</sub> was superior in M2 macrophages. Control experiments without *E. coli* revealed marginal LM formation in either M1 or M2 macrophages that were below the detection limit in these



incubations (Supplemental Table S4) but are still relevant during several pathophysiological chronic diseases (18). Correct macrophage polarization was assured by flow cytometry analysis of surface markers CD54 and -80 for M1 and CD163 and -206 for M2 (Fig. 1D). Alterations of the phenotype during 180 min incubations of M1 and M2 with *E. coli* (i.e., CD54, -80 for M1 and CD163, -206 for M2) were not observed, and *E. coli* incubation without cells failed to produce appreciable amounts of LM (unpublished results, see ref. 12).

Challenge of M1 macrophages by *E. coli* failed to produce abundant SPM below the detection limit of our analytical method (Supplemental Table S4), and the production of monohydroxylated SPM precursors was also minute as compared with M2 macrophages that generated substantial amounts of bioactive SPM including LXA<sub>4</sub>, RvD2, -D4, -D5, Mar1, PD1, AT-PD1, and RvE3 as well as respective precursors (Fig. 1B and Supplemental Table S4). Accordingly, and in agreement with our previous study (12), protein expression of human 15-LOX-1, one of the key enzymes for SPM formation (22, 23), was not detectable in polarized M1 cells but abundantly expressed in the M2 phenotype (Fig. 1C). However, human 15-LOX-2 was reported by Snodgrass *et al.* (24) to be equally expressed in both macrophage phenotypes and to be capable of producing 15-HETE and 15-HEPE as well as DHA-derived 17-hydroxy DHA (HDHA). Note that isolated human 15-LOX-2 lacks the dual reaction specificity that is unique for human 15-LOX-1 that also generates 12-HETE, 12-HEPE, and 14-HDHA (in an ~10:1 ratio, at least for 15-HETE:12-HETE) (25). The dual reaction specificity of human 15-LOX-1 might be advantageous for SPM biosynthesis in M2 and may explain why all detectable 12-LOX products, including MaR1, were much higher in M2 *vs.* M1 macrophages, although 12-LOX levels did not differ between the phenotypes, suggesting that 15-LOX-1 can contribute to the biosynthesis of these LMs as well.

To evaluate how blockade of COX-1 or COX-2 affects the LM profiles in bacteria-challenged macrophages, the clinically used COX-1/2 inhibitor ibuprofen and the COX-2-selective celecoxib were studied. Pretreatment with both drugs for 15 min at 37 °C efficiently suppressed the formation of PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, and TXB<sub>2</sub> in M1 and M2 phenotypes to a similar degree (Fig. 2A), even though the absolute capacities to biosynthesize PGE<sub>2</sub> were strikingly higher in M1 over M2 cells (Fig. 2B). Moreover, formation of the COX products 11-HETE and 11-HEPE (26) was effectively reduced by ibuprofen or celecoxib in M1 and to a minor extent also in M2 macrophages. Interestingly, both COX inhibitors significantly reduced 15-HETE biosynthesis in M1 (by ~70%) but not in M2 cells (Fig. 2).

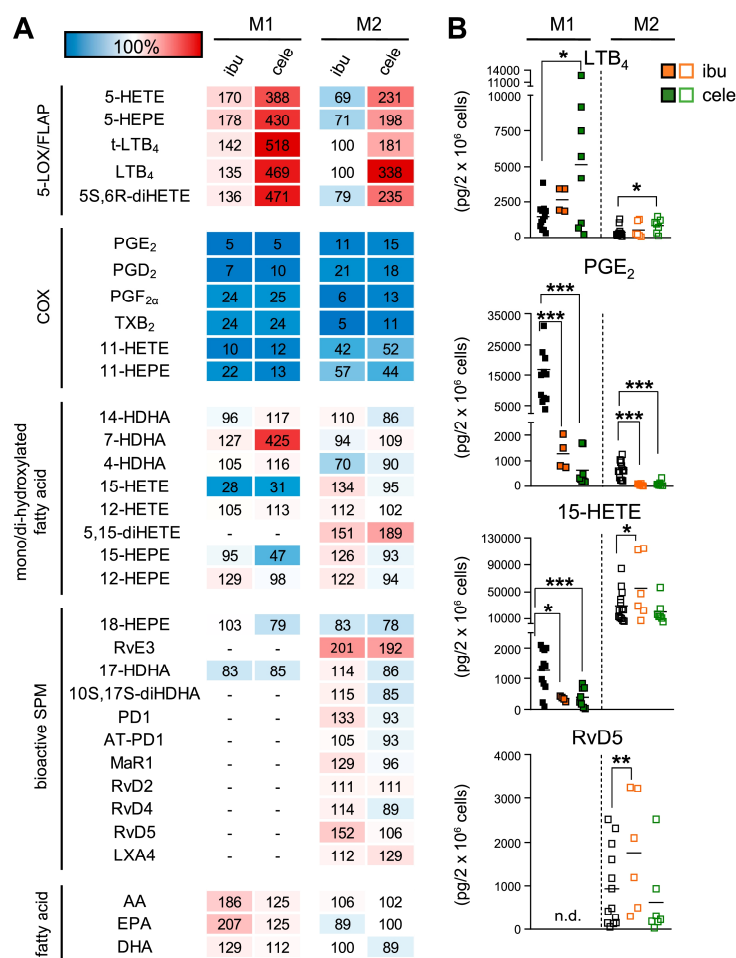
In both macrophage phenotypes, particularly in M1, the biosynthesis of the 5-LOX products LTB<sub>4</sub> and its *trans*-isomers, 5-HETE, 5-HEPE, and 5S,6R-diHETE was strongly increased by celecoxib and, to a minor degree, by ibuprofen (at least in M1, Fig. 2), probably as a result of AA substrate shunting from the COX toward the 5-LOX and FLAP pathway as reported by Mazaleuskaya *et al.* (26). Notably, also 7-HDHA levels were increased by celecoxib in M1 (Fig. 2A) but not in M2 macrophages, which suggests an involvement of the 5-LOX pathway in M1 as well. SPM biosynthesis in the M2 phenotype was not suppressed by

the two COX inhibitors and rather slightly increased by ibuprofen. The levels of AA and EPA were strongly elevated by ibuprofen in M1 with minor impact on DHA, whereas in M2 macrophages such alterations were not observed (Fig. 2). Conclusively, the prominent blockade of both COX isoforms results in elevated free AA and EPA levels in M1 macrophages because AA and EPA cannot be converted to the respective COX products that actually dominate the LM profile of M1 and in shunting of LM formation toward proinflammatory 5-LOX products as observed by Mazaleuskaya *et al.* (26), whereas in M2 macrophages, the COX isoforms are less expressed with consequent little elevation for SPM levels.

### Differential effects of 5-LOX and FLAP inhibitors on LM biosynthesis

Because inhibitors of 5-LOX and of FLAP are uniformly used to suppress the biosynthesis of LT and of other 5-LOX products (6), we next studied the clinically validated 5-LOX inhibitor zileuton (27) and the well-recognized FLAP inhibitor MK886 (28) in *E. coli*-induced LM biosynthesis in M1 and M2 macrophages side by side. In M1, low concentrations of zileuton (300 nM) and MK886 (30 nM) efficiently blocked the formation of LTB<sub>4</sub> and its *trans*-isomers by >50% with similar or somewhat minor efficiency for 5-HETE and 5-HEPE; at 3 μM, both inhibitors suppressed 5-LOX products by >85% in M1 macrophages (Fig. 3A, B). This is in sharp contrast to the M2 phenotype, in which 300 nM zileuton and 30 nM MK886 failed to significantly inhibit 5-LOX product formation; LTB<sub>4</sub> and 5-HETE levels remained >80%. Intriguingly, even at high inhibitor concentrations (3 μM), inhibition of 5-LOX product biosynthesis was much less pronounced in M2 macrophages with only 30–40% inhibition (Fig. 3A, B). In contrast, when the classic 5-LOX stimulus Ca<sup>2+</sup>-ionophore A23187 was used instead of *E. coli*, the 5-LOX inhibitory potencies of zileuton and MK886 were not different between M1 and M2 macrophages (Fig. 3C), with IC<sub>50</sub> values in the low nM range. Because A23187 failed to induce appreciable amounts of SPM and 15-LOX-1 products in both cell types (unpublished results), it was not further used in this study.

COX product formation was essentially not affected by zileuton or MK886, neither in M1 nor in M2 macrophages after *E. coli* stimulation. However, striking differential effects of zileuton and MK886 were obvious for the modulation of SPM biosynthesis and their precursors, particularly in M2 cells, which is in line with our previous study (12): 1) zileuton (3 μM), but not MK886, consistently suppressed (30–40%) the formation of 12-LOX- and 15-LOX-derived monohydroxylated products (i.e., DHA-derived 17-HDHA and 14-HDHA, AA-derived 15-HETE and 12-HETE, and EPA-derived 15-HEPE and 12-HEPE); 2) zileuton (3 μM) blocked the formation of DHA-derived RvD2, RvD5, and Mar1 as well as the SPM derivatives 5,15-diHETE and 10S,17S-diHDHA, which were all elevated by low-dose MK886 (30 nM) and even more pronounced upon 3 μM MK886 treatment; 3) formation of EPA-derived RvE3 and its precursor 18-HEPE was inhibited by zileuton but not by MK886 (3 μM each, Fig. 3A, B). In contrast, AA-derived LXA<sub>4</sub> formation in M2 macrophages was reduced by both inhibitors, similar to



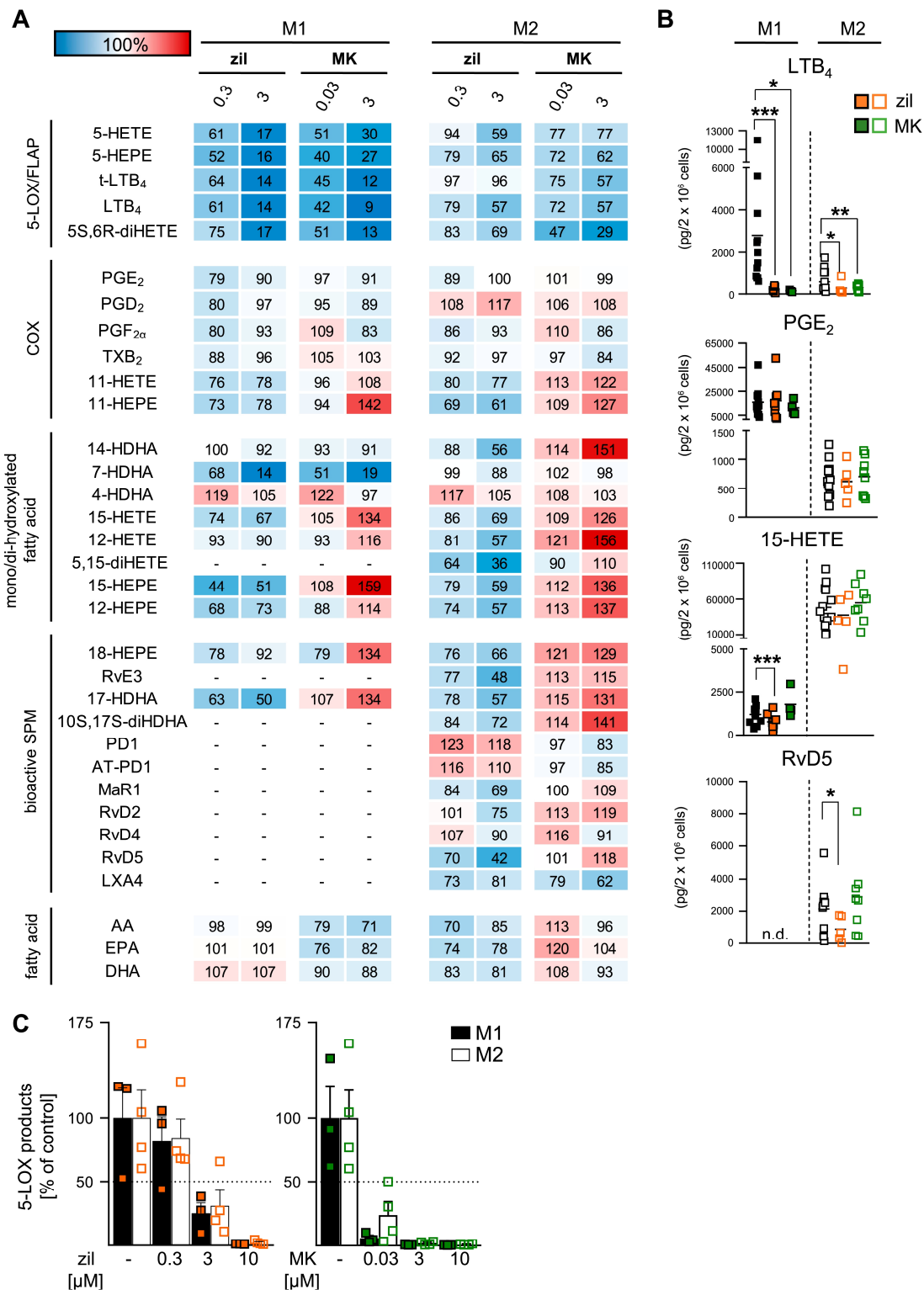
**Figure 2.** Effects of the COX inhibitors ibuprofen and celecoxib on LM biosynthesis in M1 and M2 macrophages. **A)** Human M1 or M2 ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were preincubated with 30  $\mu$ M ibuprofen (ibu), 3  $\mu$ M celecoxib (cele), or vehicle (0.1% DMSO) for 15 min at 37 °C before incubation with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio 1:50) for another 180 min. Formed LMs were extracted by SPE and analyzed by UPLC-MS-MS; means are shown in a heat map as percentage of vehicle-treated cells (= 100% control, white). For ibu,  $n = 4$  in M1 ( $n = 3$  for 17-HDHA), and  $n = 6$  in M2 ( $n = 4$  for RvD2;  $n = 5$  for RvD4 and LXA<sub>4</sub>). For cele,  $n = 8$  in M1 ( $n = 5$  for 14-HDHA, 15-HEPE, 12-HEPE, and 17-HDHA;  $n = 7$  for 12-HETE) and  $n = 7$  in M2 ( $n = 6$  for RvE3, MaR1, RvD4). **B)** Effects of ibu (orange) and cele (green) on LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, 15-HETE, and RvD5 biosynthesis in M1 and M2 cells, shown as picogram (pg)/2  $\times 10^6$  cells. N.d., not detectable. Data were log-transformed for Student's paired *t* test. Ibu vs. vehicle in M1: LTB<sub>4</sub>,  $P = 0.1675$ ; PGE<sub>2</sub>,  $***P = 0.00016$ ; 15-HETE,  $*P = 0.0118$ , and in M2: LTB<sub>4</sub>,  $P = 0.8733$ ; PGE<sub>2</sub>,  $***P = 0.000011$ ; 15-HETE,  $*P = 0.0360$ ; RvD5,  $***P = 0.0089$ . Cele vs. vehicle in M1: LTB<sub>4</sub>,  $*P = 0.0242$ ; PGE<sub>2</sub>,  $***P = 0.000001$ ; 15-HETE,  $***P = 0.000002$ , and in M2: LTB<sub>4</sub>,  $*P = 0.0139$ ; PGE<sub>2</sub>,  $***P = 0.000119$ ; 15-HETE,  $P = 0.4608$ ; RvD5,  $P = 0.6133$ .

LTB<sub>4</sub> formation. Moreover, whereas zileuton and MK886 strongly (>80%) blocked 7-HDHA formation in M1 macrophages, both inhibitors failed in this respect in the M2 phenotype, suggesting that 7-HDHA in M2 macrophages is formed independent of 5-LOX or FLAP. The product 4-HDHA and the PDs PD1 and AT-PD1 were hardly affected by 5-LOX and FLAP inhibition. Alterations of AA, EPA, and DHA levels that were due to the inhibitors were moderate without conclusive tendencies. Together, both zileuton and MK886 strongly inhibit LT biosynthesis primarily in M1 macrophages, whereas only the 5-LOX inhibitor zileuton suppresses also 12-LOX- and 15-LOX-derived products (including SPM) in M2 cells, in which the FLAP inhibitor MK886 elevates formation of SPMs and their precursors, especially those that are derived from DHA.

### Targeting 15-LOX-1 activity in M2 macrophages suppresses SPM formation and increases proinflammatory 5-LOX product biosynthesis

To study the role of 15-LOX-1 in LM formation in *E. coli*-activated M1 and M2 macrophages, the 15-LOX-1-selective inhibitor 3887 (17, 29) (Supplemental Fig. S2A)

was used. In line with the moderate protein expression of 15-LOX-1 in M1, LM formation was essentially unaffected by 300 nM 3887 in this macrophage subtype (alterations <25%), regardless of the biosynthetic LM pathway (*i.e.*, COX, 5-LOX, 12-LOX, and 15-LOX-1; Fig. 4A, C). In M2, however, the formation of 15-LOX-1-related mono-hydroxylated products, such as 12- and 15-HETE, 12- and 15-HEPE, as well as 14- and 17-HDHA, was concentration-dependently inhibited with consistent IC<sub>50</sub>  $\approx$  200–300 nM (Fig. 4B and Supplemental Fig. S2B). We confirmed the dual reaction specificity of human 15-LOX-1 at position C15 and C12 for AA and EPA and C17 and C14 for DHA in a ratio of 10:1 (Supplemental Fig. S2C). Inhibitory effects of 3887 against 5-LOX (Supplemental Fig. S2D) or against 15-LOX-2 (29) were not evident. The formation of the 15-LOX-derived SPM—that is, LXA<sub>4</sub>, RvD2, -D4, -D5, PD1, and AT-PD1, their derivatives 5,15-diHETE and 10S,17S-diHDHA, as well as MaR1—were efficiently suppressed by 3887 (IC<sub>50</sub>  $\approx$  100–200 nM, Fig. 4B and Supplemental Fig. S2B). In parallel, 5-LOX-derived LTB<sub>4</sub>, 5-HETE, and 5-HEPE concentration-dependently increased up to about 4-fold, presumably because of substrate redirection from the 15-LOX-1 to the 5-LOX pathway. Although 15-LOX-1 was shown to be involved



**Figure 3.** Effects of the 5-LOX inhibitor zileuton (zil) and the FLAP inhibitor MK886 (MK) on LM biosynthesis in M1 and M2. A) Human M1 and M2 ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were preincubated with 0.3 or 3  $\mu$ M zileuton, 0.03 or 3  $\mu$ M MK886, or vehicle (0.1% DMSO) for 15 min at 37 °C and then incubated with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio 1:50) for another 180 min. Formed LMs were extracted by SPE and analyzed by UPLC-MS-MS, and means are shown in a heat map as percentage of vehicle-treated cells (continued on next page)



in EPA-derived RvE3 biosynthesis in eosinophils (30), exposure of M2 cells to 3887 had only minor effects of EPA-derived LM, such as 18-HEPE and RvE3 (Fig. 4 and Supplemental Fig. S2B), whereas 15-HEPE levels were strongly suppressed, as expected. In general, LMs derived from EPA were less produced compared with AA or DHA products (Supplemental Fig. S2B). Interestingly, 3887 inhibited the formation of 7-HDHA in M2 (Fig. 4A, B) but not in M1 macrophages (Fig. 4A, C); 4-HDHA was not reduced but increased (Fig. 4B), and COX product formation as well as fatty acid substrate release was hardly affected by 3887 (Fig. 4A). Together, 3887 effectively suppresses 15-LOX-1-derived product formation including AA- and DHA-derived SPMs while increasing 5-LOX-related LM biosynthesis.

### The cPLA<sub>2</sub> inhibitor RSC-3388 blocks the release of AA and EPA but not of DHA

To investigate how cPLA<sub>2</sub> inhibition affects the release of fatty acid substrates and in turn LM formation, we analyzed the LM profile of *E. coli*-stimulated M1 and M2 macrophages that were pretreated with RSC-3388, a commonly used cPLA<sub>2</sub> reference inhibitor (31). Although AA and EPA levels were significantly lowered by RSC-3388 (10  $\mu$ M), particularly in the M2 subtype, the amounts of free DHA were rather increased (Fig. 5A, C). Along these lines, the substantial formation of AA- and EPA-derived LMs (PG and LT in M1 cells and 15-LOX-derived LM in M2 cells) was effectively decreased, but DHA-derived LMs (including D-series of SPM and their precursors) were elevated by RSC-3388 (Fig. 5A, B). These data suggest that cPLA<sub>2</sub> contributes to AA and EPA release and respective LM biosynthesis, but the enzyme is dispensable for DHA liberation and DHA-derived SPM generation.

### M1 and M2 phenotype-specific network of coregulated LM

Given the broad diversity in LMs produced from bacteria-activated M1 and M2 macrophages, we analyzed the coregulation of specific LMs to enzyme-specific LM pathways in the two phenotypes under pharmacological modulation (for overview, see Supplemental Table S4). Unbiased analysis confirmed PG and LT clusters for the M1 phenotype (Fig. 6A), whereas SPMs and their 12-LOX- and 15-LOX-derived precursors associated with M2 macrophages (Fig. 6B). Thus, positively correlated LMs

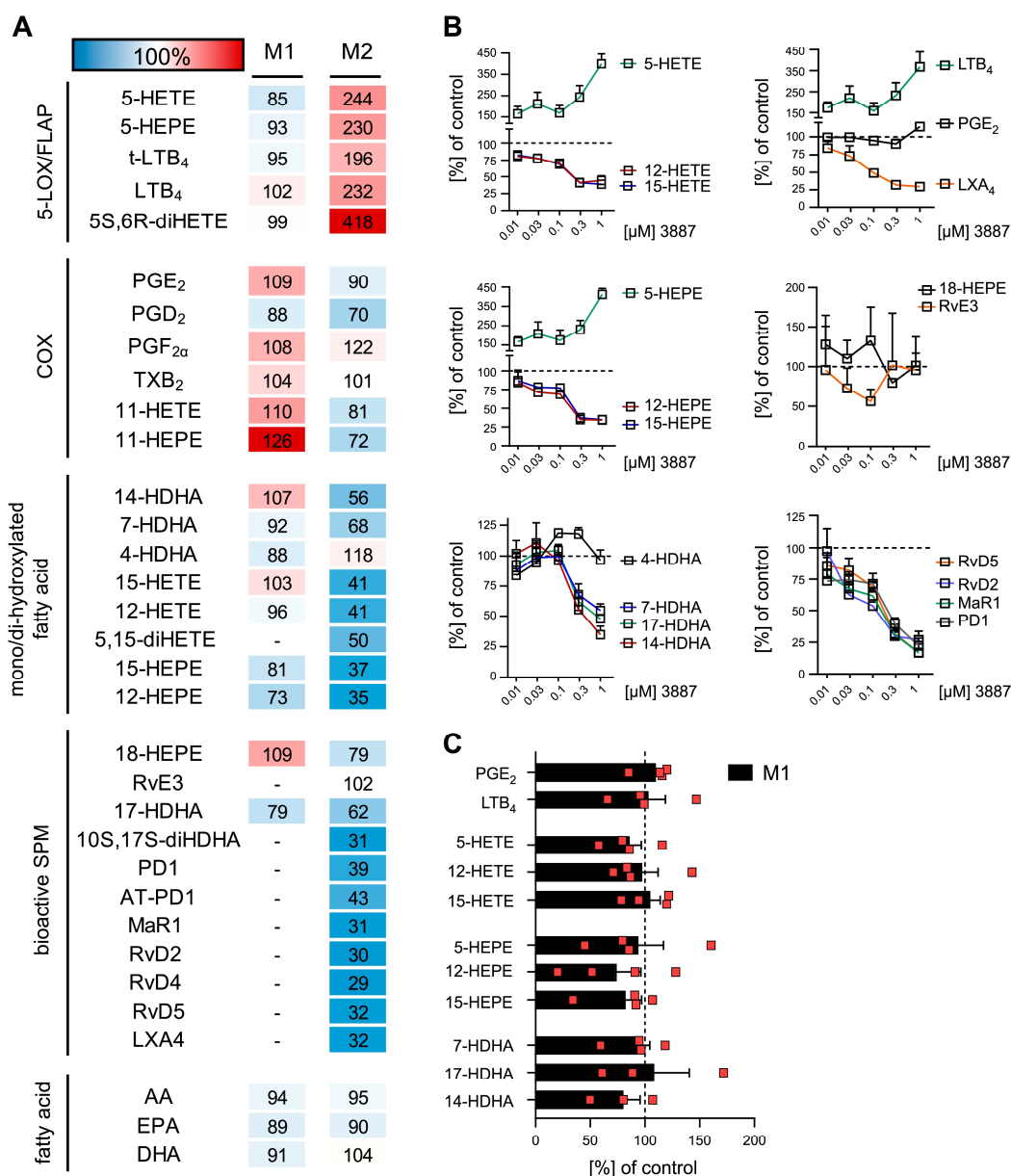
clustered in close proximity to each other, whereas distant LMs and their clusters are not coregulated. For M1, 11- and 15-HETE and 15-HEPE positively correlated with prostanoids, reflecting their proximity to the COX pathway (Fig. 6A). Another prominent cluster in M1 cells grouped the typical 5-LOX and FLAP products, and 7-HDHA represents a 5-LOX- and FLAP-derived product in M1. For M2, however, 7-HDHA was associated with the 15-LOX-1 cluster (Fig. 6B), suggesting that 7-HDHA is biosynthesized by 5-LOX in M1 macrophages but mainly by 15-LOX-1 in M2 cells. As a result of abundant 15-LOX-1 expression in M2 macrophages, 7 SPMs and 6 SPM precursors grouped together (Fig. 6B), a cluster that is absent in the M1 phenotype. The 15-HETE and 17-HDHA biosynthesis clearly dominated the M2 phenotype. Of note, solely DHA-derived SPMs coregulated in a 15-LOX-1-dependent expression manner. AA-derived 5,15-diHETE, LXA<sub>4</sub>, and EPA-derived RvE3 grouped together in a separate cluster distinct from the prominent 15-LOX-1 and 5-LOX and FLAP cluster.

## DISCUSSION

Here we present how clinically relevant anti-inflammatory drugs and prominent LM biosynthesis inhibitors modulate the formation of proinflammatory and proresolving LMs in bacteria-stimulated human M1 and M2 macrophages (for an overview, see Fig. 7). Earlier studies on such agents almost exclusively assessed their potential to suppress proinflammatory PGs or LTs, applying test systems, such as stimulated whole blood or isolated neutrophils and monocytes, that reflect solely inflammatory conditions (26, 32, 33). We present here a new experimental, cell-based approach exploiting LM lipidomics profiling with UPLC-MS-MS to comprehensively evaluate these inhibitors for their impact on the biosynthesis of various LMs that determine not only the promotion of inflammation (*i.e.*, PG and LT) but also its resolution (*i.e.*, SPM). Our results broaden the knowledge about the pharmacological profile of different LM biosynthesis inhibitors and disclose for the first time their ability to manipulate SPM biosynthesis—insights that can allow better appraisal of their therapeutic potential to intervene with inflammatory disorders.

The motivation to conduct this study originated from various reasoning. First, the discovery of differential bacteria-induced formation of proinflammatory and proresolving LMs in human macrophage phenotypes (12) enables us for the first time to assess the effects of LM

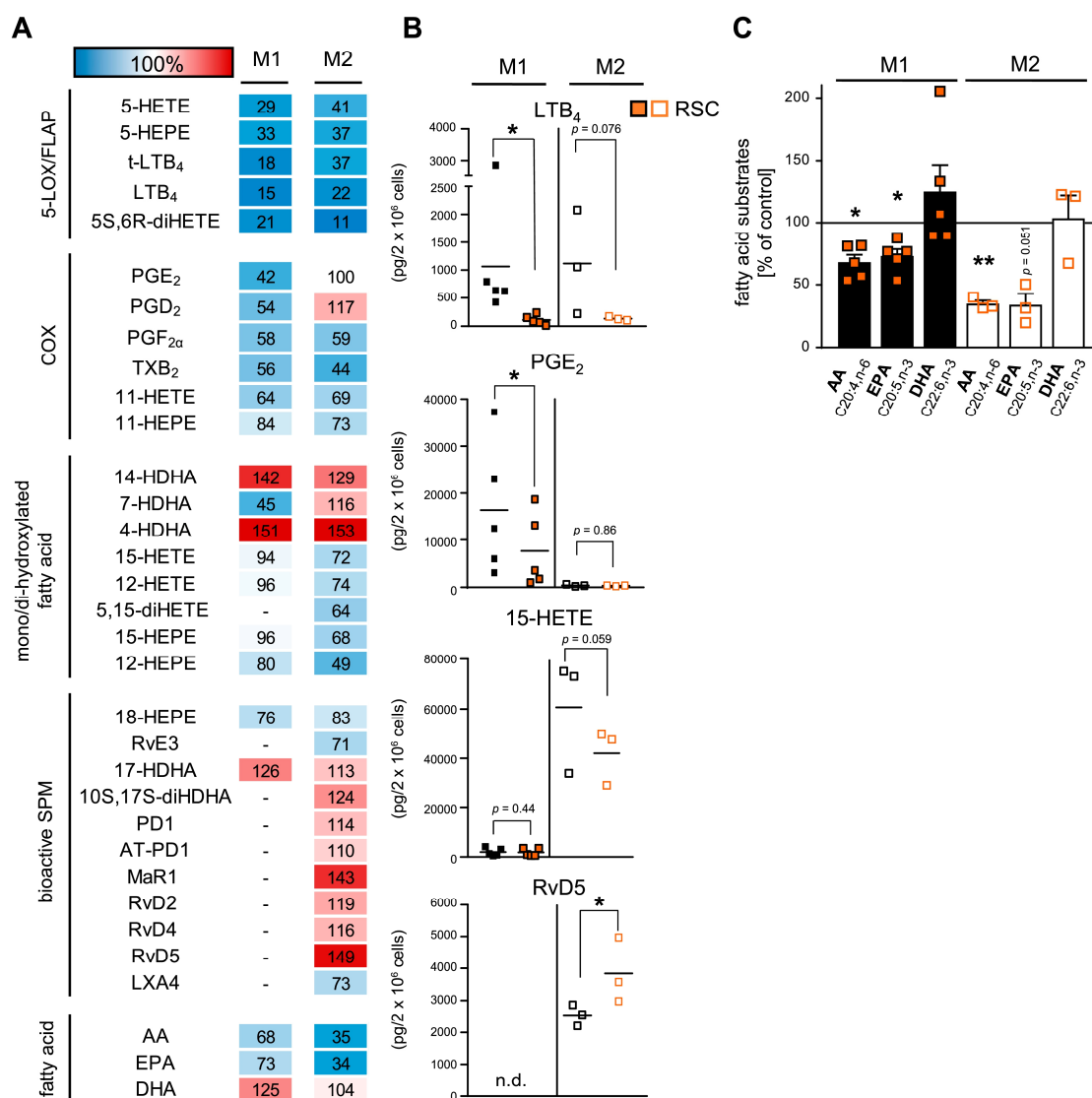
(= 100% control, white). For zil,  $n = 8$  in M1 ( $n = 4$  for 14-HDHA, 7-HDHA, 12-HETE, and 17-HDHA;  $n = 6$  for 15-HEPE and 12-HEPE;  $n = 7$  for 4-HDHA, 18-HEPE, and DHA) and  $n = 5$  in M2 ( $n = 4$  for LXA<sub>4</sub>). For MK,  $n = 4$  in M1 and  $n = 8$  in M2 ( $n = 6$  for RvD2;  $n = 7$  for MaR1;  $n = 4$  for LXA<sub>4</sub>). B) Effects of 3  $\mu$ M zileuton (zil, orange) and 3  $\mu$ M MK886 (MK, green) on LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, 15-HETE, and RvD5 biosynthesis in M1 and M2, shown as pg/ $2 \times 10^6$  cells. Data were log-transformed for paired Student's *t* test. N.d., not detectable. Zil vs. vehicle in M1: LTB<sub>4</sub>, \*\*\* $P = 0.000006$ ; PGE<sub>2</sub>,  $P = 0.274$ ; 15-HETE, \*\*\* $P = 0.00016$ , and in M2: LTB<sub>4</sub>, \* $P = 0.0475$ ; PGE<sub>2</sub>,  $P = 0.896$ ; 15-HETE,  $P = 0.0797$ ; RvD5, \* $P = 0.0125$ . MK vs. vehicle in M1: LTB<sub>4</sub>, \* $P = 0.0234$ ; PGE<sub>2</sub>,  $P = 0.329$ ; 15-HETE,  $P = 0.1324$ , and in M2: LTB<sub>4</sub>, \*\* $P = 0.0083$ ; PGE<sub>2</sub>,  $P = 0.706$ ; 15-HETE,  $P = 0.0719$ ; RvD5,  $P = 0.2800$ . C) M1 and M2 ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were preincubated with zileuton, MK886, or vehicle (0.1% DMSO) for 15 min at 37 °C and then incubated with A23187 (2.5  $\mu$ M) for another 10 min. Formed 5-LOX products (LTB<sub>4</sub>, its isomers, 5-HETE, 5S,6R-diHETE, and 5-HEPE) were extracted by SPE and analyzed by UPLC-MS-MS. Data are given as means  $\pm$  SEM,  $n = 4$  independent experiments, shown as percentage of vehicle control (= 100%).



**Figure 4.** Effects of the 15-LOX-1 inhibitor 3887 on LM biosynthesis in M1 and M2. **A)** Human M1 and M2 ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were preincubated with 300 nM 3887 or vehicle (0.1% DMSO) for 15 min at 37 °C before incubation with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio 1:50) for another 180 min. Formed LMs were extracted by SPE and analyzed by UPLC-MS-MS, and results are given as percentages of vehicle-treated cells (= 100% control, white) shown as means in a heat map. **B)** Concentration-dependent inhibition of LM formation derived from AA (top), EPA (middle), and DHA (bottom) by 3887 in M2. **C)** Effects of 300 nM 3887 on LM formation in M1. Data are expressed as means + SEM of  $n = 4$  in M1 ( $n = 3$  for 14-HDHA and 17-HDHA) and  $n = 3$  in M2, independent experiments, shown as percentage of uninhibited control (= 100%).

biosynthesis inhibitors under pathophysiologically relevant conditions that reflect either inflammation-promoting (M1-like) or inflammation-resolving (M2-like) potential. Second, COX and 5-LOX or FLAP inhibitors are considered beneficial in inflammation therapy because of the blockade of the formation of proinflammatory PGs and LTs (34), but how these drugs influence SPM biosynthesis, and thus resolution of inflammation is elusive (35, 36). Third, the

biosynthetic pathways of LMs are organized within connected cascades that can crosstalk within a complex network (14, 15), and therefore, pharmacological interference with one pathway may redirect toward other LM routes. In fact, COX inhibitors and the 15-LOX-1 inhibitor 3887 each increased formation of proinflammatory 5-LOX products. Fourth, proinflammatory and proresolving LMs might be partially biosynthesized by common enzymes, such as

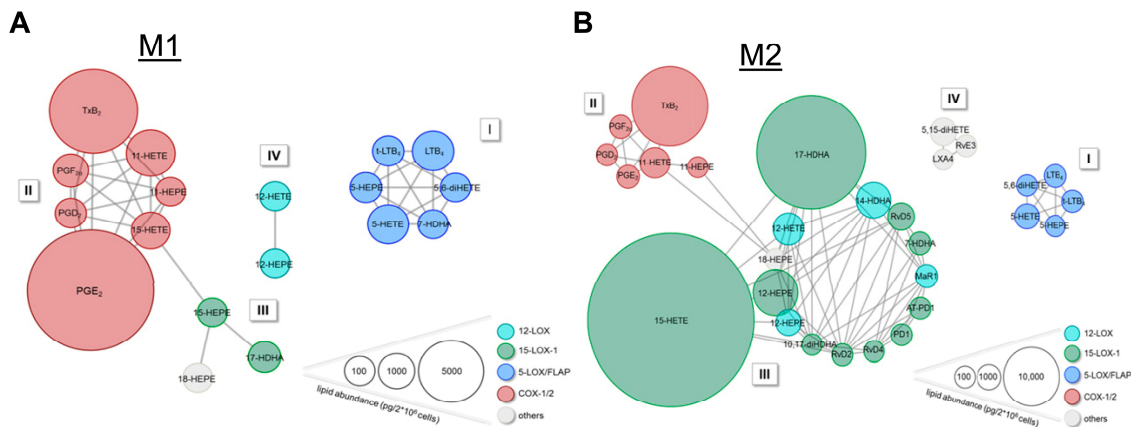


**Figure 5.** Effects of the cPLA<sub>2</sub> inhibitor RSC-3388 on LM biosynthesis in M1 and M2. **A**) Human M1 and M2 ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were preincubated with 10  $\mu$ M RSC-3388 or vehicle (0.1% DMSO) for 15 min at 37 °C before incubation with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio 1:50) for another 180 min. Formed LMs were extracted by SPE and analyzed by UPLC-MS-MS, and means are shown in a heat map as percentages of vehicle-treated cells (= 100% control, white) of  $n = 5$  in M1 ( $n = 2$  for 14-HDHA;  $n = 3$  for 7-HDHA, 12-HETE, and 17-HDHA;  $n = 4$  for 15-HEPE and 12-HEPE) and  $n = 3$  in M2. **B**) Effects of RSC-3388 on LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, 15-HETE, and RvD5 biosynthesis in M1 and M2 shown as pg/2  $\times 10^6$  cells. **C**) Effects of 10  $\mu$ M RSC-3388 on free AA, EPA, and DHA levels in M1 and M2 shown as percentage of vehicle control. N.d., not detectable. Data were log-transformed for statistical analysis, paired Student's *t* test; RSC vs. vehicle in M1: LTB<sub>4</sub>,  $*P = 0.0105$ ; PGE<sub>2</sub>,  $*P = 0.0161$ ; 15-HETE,  $P = 0.4427$ ; AA,  $*P = 0.0102$ ; EPA,  $*P = 0.0165$ ; DHA,  $P = 0.3332$  and in M2: LTB<sub>4</sub>,  $P = 0.0764$ ; PGE<sub>2</sub>,  $P = 0.8617$ ; 15-HETE,  $P = 0.0590$ ; RvD5,  $*P = 0.0377$ ; AA,  $**P = 0.0047$ ; EPA,  $P = 0.0507$ ; DHA,  $P = 0.9974$ .

5-LOX or FLAP, that mediate formation of LTs but possibly also of LXs and Rvs (37). This implies that 5-LOX and FLAP inhibitors block inflammation but also may hamper resolution. Indeed, zileuton suppressed SPM formation, whereas FLAP inhibition failed in this respect and instead elevated SPM levels. Together, our data highlight the contribution of key enzymes in LM biosynthesis under pathophysiologically relevant conditions, and they suggest that drugs that act on these key enzymes may affect the overall

LM network with potential consequences for the pharmacotherapy of inflammation.

LMs produced *via* the COX-1/2 pathway display proinflammatory but also protective actions depending on stimulus, cell type, and status that program the ability to resolve inflammation (5, 38). Although beneficial effects of NSAIDs are well established for alleviating acute inflammation and pain (26, 39), they cause severe on-target side effects and may negatively impact inflammation

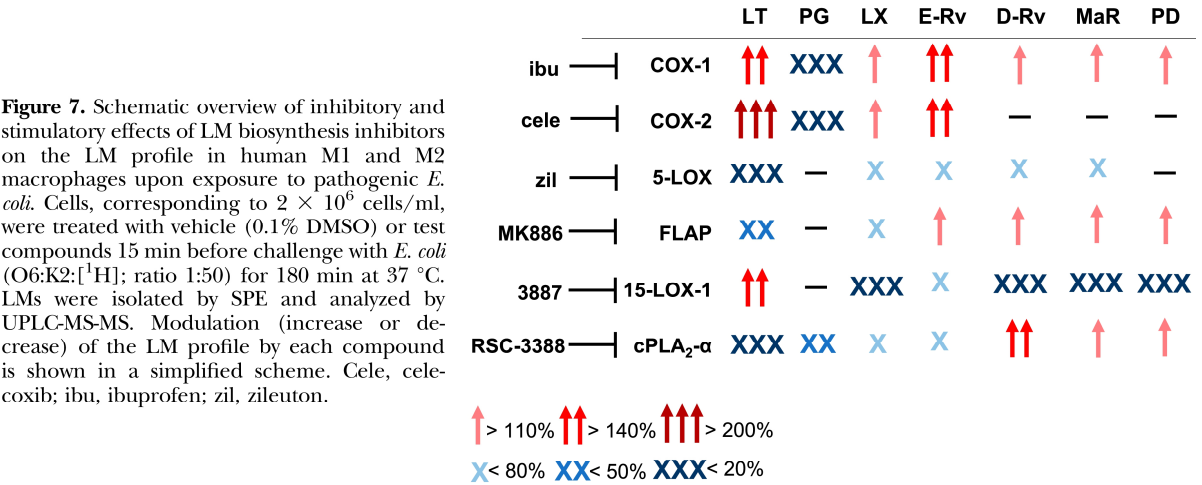


**Figure 6.** Network of coregulated eicosanoids and docosanoids in M1 and M2 macrophages. M1 (A) and M2 cells (B), corresponding to  $2 \times 10^6$  cells/ml, were treated with vehicle (0.1% DMSO) or test compounds 15 min before challenge with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio 1:50) for 180 min at 37 °C. LMs were isolated by SPE and analyzed by UPLC-MS-MS. Visualization of positive LM/LM correlations as circular network with  $r \geq 0.7$ . Nodes visualize the LM; for color and size meanings see legend.

resolution (35, 40). Thus, COX-2-deficient mice failed to resolve from inflammation, and the COX inhibitor indomethacin exacerbated inflammation because of reduced proresolving PGD<sub>2</sub> levels (41). Also, COX-2-derived PGD<sub>2</sub> ameliorated colonic inflammation in rats (42). In our study, both COX inhibitors efficiently reduced all prostanoids and caused a strong shift to the 5-LOX- and FLAP-mediated LT biosynthesis pathway in M1 and M2 macrophages but, interestingly, not to the 15-LOX and DHA pathway and SPM formation in the M2 phenotype. Elevated LT levels that were due to COX-1/2 inhibition are well known and are seemingly causative for increased risk for asthma, and more frequent gastrointestinal lesions might be due to LTB<sub>4</sub>-elicited neutrophil infiltration (9, 43).

The proinflammatory functions of LTs are reflected by LTB<sub>4</sub> as potent chemo-attractant for neutrophils (44) and by cysteinyl-LTs that increase microvascular permeability and immune cell recruitment (45). Suppression of LT formation by targeting the 5-LOX pathway is a therapeutic

strategy to treat inflammatory disorders, neglecting, however, the role of 5-LOX in the biosynthesis of proresolving mediators, such as LXA<sub>4</sub> (46, 47). 5-LOX and FLAP are essential for LT biosynthesis (45) and apparently also for LX and Rv formation (12, 37, 48). However, our data with the 5-LOX inhibitor zileuton (27) and the FLAP inhibitor MK886 (28) in M1 and M2 macrophages reveal differential and more complex functions for 5-LOX and FLAP. Thus, zileuton blocked the formation of LT and SPM (LXA<sub>4</sub> and Rv), that supports the role of 5-LOX in LT and in LX and Rv formation. This suggests that zileuton and other 5-LOX inhibitors could interfere with inflammation resolution by inhibiting SPM biosynthesis. We also observed suppression of 15-LOX products by zileuton in M2 cells that were possibly due to direct interference with 15-LOX-1 that shares structural features with 5-LOX in the active site (49). In contrast, MK886 selectively suppressed LT biosynthesis, whereas, in agreement with our previous report (12), 15-LOX-1 products are increased in



**Figure 7.** Schematic overview of inhibitory and stimulatory effects of LM biosynthesis inhibitors on the LM profile in human M1 and M2 macrophages upon exposure to pathogenic *E. coli*. Cells, corresponding to  $2 \times 10^6$  cells/ml, were treated with vehicle (0.1% DMSO) or test compounds 15 min before challenge with *E. coli* (O6:K2:[<sup>1</sup>H]; ratio 1:50) for 180 min at 37 °C. LMs were isolated by SPE and analyzed by UPLC-MS-MS. Modulation (increase or decrease) of the LM profile by each compound is shown in a simplified scheme. Cele, celecoxib; ibu, ibuprofen; zil, zileuton.



M2 macrophages, especially D-series Rv and MaR1. Obviously, zileuton and MK886 were much less efficient to inhibit *E. coli*-induced LT formation in M2 than in M1 cells, which is not readily understood. In control experiments with A23187, however, this bias was abolished, excluding unequal inhibitor availability in M1 and M2 macrophages or differential 5-LOX and FLAP expression as reasons. Possibly, the potency of zileuton and MK886 may depend on the signaling pathways that lead to activation of 5-LOX (e.g., phosphorylation and oxidative tone), which may differ for activation by A23187 and by pathogenic *E. coli* in M1 and M2 subtypes. Indeed, differential potencies for other 5-LOX inhibitors depending on kinase signaling and oxidative tone were observed before (50, 51).

We propose that 5-LOX subcellular localization and differential access to AA *vs.* DHA determines whether LTs or DHA-derived SPMs are preferably formed by 5-LOX, depending on the interaction with FLAP. Experimental evidence suggests that when activated 5-LOX interacts with FLAP at the nuclear membrane, AA is presented by FLAP and 5-LOX converts it to LT (52). But when 5-LOX is activated in a nonnuclear compartment and distant from FLAP [e.g., if 5-LOX phosphorylation at Ser271 is blocked (53) or FLAP inhibitors like MK886 prevent the interaction with FLAP (12)] then 5-LOX may preferably access DHA-derived intermediates to biosynthesize specific SPMs. In fact, in MK886-treated M2 cells, formation of the AA-derived SPM LXA<sub>4</sub> is reduced as LTB<sub>4</sub>, but DHA-derived SPMs are still produced (Fig. 3A). We showed before that targeting of FLAP by MK886 in M2 macrophages precludes the interaction with 5-LOX at the nuclear membrane (12), supporting the hypothesis by other researchers (53) about a differentially regulated nonnuclear 5-LOX favoring the biosynthesis of proresolving LMs. In murine liver injury, the FLAP inhibitor BAY X-1005 reduced cysteinyl-LT formation but elevated SPM levels (54). Therefore, FLAP might be negligible for the biosynthesis of D-series Rv in M2 macrophages, and hence FLAP inhibitors may be more beneficial as anti-inflammatory drugs than direct 5-LOX inhibitors because they suppress proinflammatory LTs but might maintain SPM biosynthesis to enable resolution of inflammation, such as PDs and MaRs that do not rely on 5-LOX for their biosynthesis (55, 56).

Expression of 15-LOX-1 is characteristic for the M2 phenotype, as well as its high capacity to biosynthesize SPM compared with the M1 subset (12). However, 15-LOX-1 is a versatile enzyme that plays a role in both the onset and the termination of immune responses (10, 11, 57, 58). Recently, an anti-inflammatory role of 15-LOX and a related SPM in mouse skin was reported with implications for the maintenance of dermal integrity (59). In fact, current developments focus on small molecule 15-LOX activators to foster SPM formation and abrogate LT and PG production (60). On the other hand, 3887 inhibited dendrite and podosome formation in human dendritic cells, indicating an anti-inflammatory effect of 15-LOX-1 inhibitors (17). Targeting 15-LOX-1 by the selective inhibitor 3887 (17, 29) in M2 macrophages blocked the formation of all detectable SPMs. The inhibitor 3887, like COX inhibitors, redirected AA toward the 5-LOX pathway in the M2 phenotype with increased LTB<sub>4</sub> and 5-HETE levels,

indicating that both 15-LOX-1 and COX inhibitors have a complex effect mechanism of action and influence both inflammation and resolution. This suggests careful consideration of application and use of these inhibitors as potential therapeutics where LTs promote the disease and SPMs beneficially contribute to resolution and tissue regeneration (48).

cPLA<sub>2</sub> provides fatty acid substrates for COX and LOX to generate LMs (61). Results with the cPLA<sub>2</sub> inhibitor RSC-3388 support an involvement of cPLA<sub>2</sub> in AA and EPA release, particularly in M2 cells, in which cPLA<sub>2</sub> protein levels were higher than in M1 macrophages, accompanied by reduced levels of AA- and EPA-derived 5-LOX and 15-LOX products. Remarkably, RSC-3388 increased DHA levels and promoted the formation of DHA-derived SPMs as well as the respective precursors. Discrimination of DHA from AA release was reported earlier by Shikano *et al.* (62), and it was suggested that DHA supply in macrophages for SPM biosynthesis is mediated by secreted PLA<sub>2</sub> group IID (63).

Together, metabololipidomics of broad-spectrum LMs produced in bacteria-challenged human proinflammatory M1 and anti-inflammatory M2 macrophages led to important, partially unexpected insights into the pharmacological manipulation of bioactive LMs that determine initiation or resolution of inflammation. The pharmacological profiles of these drugs and agents that act on discrete LM biosynthetic enzymes can impact the overall LM network with potential consequences for inflammation pharmacotherapy. In search of more efficient and safer anti-inflammatory drugs, our data prompt for better consideration of the effects of such agents on SPM formation that may translate into resolution-based pharmacology as alternative strategies to resolve chronic inflammation. [F]

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB1127, ChemBioSys, and SFB1278, Polytarget). J.G. received a Carl-Zeiss stipend, and C.N.S. was supported by U.S. National Institutes of Health, National Institute of General Medical Sciences Grant P01GM095467. The authors declare no conflicts of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

M. Werner performed the ibuprofen, celecoxib, zileuton, RSC-3388 experiments and performed the network analysis; P. M. Jordan performed the 3887 experiments, flow cytometry analysis, and A23187 studies; E. Romp performed MK886 experiments; A. Czapka, Z. Rao, and C. Kretzer performed Western blots; M. Werner, P. M. Jordan, A. Czapka, S. Pace, and J. Gerstmeier performed data analysis and prepared graphs; M. Werner, A. Koeberle, and J. Gerstmeier developed the ultraperformance liquid chromatography method; H.-E. Claesson supplied 3887; C. N. Serhan, O. Werz, and J. Gerstmeier designed the study; O. Werz and J. Gerstmeier wrote the manuscript; and all authors contributed to manuscript preparation.



## REFERENCES

- Chiang, N., Fredman, G., Bäckhed, F., Oh, S. F., Vickery, T., Schmidt, B. A., and Serhan, C. N. (2012) Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature* **484**, 524–528
- Serhan, C. N. (2014) Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* **510**, 92–101
- Spite, M., Clària, J., and Serhan, C. N. (2014) Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases. *Cell Metab.* **19**, 21–36
- Tabas, I., and Glass, C. K. (2013) Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* **339**, 166–172
- Rainsford, K. D. (2007) Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell. Biochem.* **42**, 3–27
- Werz, O., Gerstmeier, J., and Garscha, U. (2017) Novel leukotriene biosynthesis inhibitors (2012–2016) as anti-inflammatory agents. *Expert Opin. Ther. Pat.* **27**, 607–620
- Serhan, C. N., and Petasis, N. A. (2011) Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem. Rev.* **111**, 5922–5943
- Conte, M. S., Desai, T. A., Wu, B., Schaller, M., and Werlin, E. (2018) Pro-resolving lipid mediators in vascular disease. *J. Clin. Invest.* **128**, 3727–3735
- Rainsford, K. D. (1993) Leukotrienes in the pathogenesis of NSAID-induced gastric and intestinal mucosal damage. *Agents Actions* **39**, C24–C26
- Andersson, C. K., Claesson, H. E., Rydell-Törmänen, K., Swedmark, S., Hällgren, A., and Erjefält, J. S. (2008) Mice lacking 12/15-lipoxygenase have attenuated airway allergic inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **39**, 648–656
- Claesson, H. E. (2009) On the biosynthesis and biological role of eoxins and 15-lipoxygenase-1 in airway inflammation and Hodgkin lymphoma. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **89**, 120–125
- Werz, O., Gerstmeier, J., Liberos, S., De la Rosa, X., Werner, M., Norris, P. C., Chiang, N., and Serhan, C. N. (2018) Human macrophages differentially produce specific resolvins or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. *Nat. Commun.* **9**, 59
- Dalli, J., Colas, R. A., and Serhan, C. N. (2013) Novel n-3 immunoresolvents: structures and actions. *Sci. Rep.* **3**, 1940; erratum: 4, 6726
- Yang, K., Ma, W., Liang, H., Ouyang, Q., Tang, C., and Lai, L. (2007) Dynamic simulations on the arachidonic acid metabolic network. *PLOS Comput. Biol.* **3**, e55
- He, C., Wu, Y., Lai, Y., Cai, Z., Liu, Y., and Lai, L. (2012) Dynamic eicosanoid responses upon different inhibitor and combination treatments on the arachidonic acid metabolic network. *Mol. Biosyst.* **8**, 1585–1594
- Motwani, M. P., and Gilroy, D. W. (2015) Macrophage development and polarization in chronic inflammation. *Semin. Immunol.* **27**, 257–266
- Han, H., Liang, X., Ekberg, M., Kritikou, J. S., Brunnström, Å., Pelcman, B., Matl, M., Miao, X., Andersson, M., Yuan, X., Schain, F., Parvin, S., Melin, E., Sjöberg, J., Xu, D., Westerberg, L. S., Björkholm, M., and Claesson, H. E. (2017) Human 15-lipoxygenase-1 is a regulator of dendritic-cell spreading and podosome formation. *FASEB J.* **31**, 491–504
- Colas, R. A., Shinohara, M., Dalli, J., Chiang, N., and Serhan, C. N. (2014) Identification and signature profiles for pro-resolving and inflammatory lipid mediators in human tissue. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **307**, C39–C54
- Dalli, J., and Serhan, C. N. (2012) Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* **120**, e60–e72
- Pace, S., Pergola, C., Dehm, F., Rossi, A., Gerstmeier, J., Troisi, F., Pein, H., Schaible, A. M., Weinigel, C., Rummeler, S., Northoff, H., Laufer, S., Maier, T. J., Rådmark, O., Samuelsson, B., Koerberle, A., Sautebin, L., and Werz, O. (2017) Androgen-mediated sex bias impairs efficiency of leukotriene biosynthesis inhibitors in males. *J. Clin. Invest.* **127**, 3167–3176
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J. L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Genderachter, J. A., Vogel, S. N., and Wynn, T. A. (2014) Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14–20
- Aursnes, M., Tungen, J. E., Colas, R. A., Vlasakov, I., Dalli, J., Serhan, C. N., and Hansen, T. V. (2015) Synthesis of the 16S,17S-epoxyprotectin intermediate in the biosynthesis of protectins by human macrophages. *J. Nat. Prod.* **78**, 2924–2931
- Primdahl, K. G., Tungen, J. E., De Souza, P. R. S., Colas, R. A., Dalli, J., Hansen, T. V., and Vik, A. (2017) Stereocontrolled synthesis and investigation of the biosynthetic transformations of 16(S),17(S)-epoxy-PD<sub>n-3</sub>DPA. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 8606–8613
- Snodgrass, R. G., Zezina, E., Namgaladze, D., Gupta, S., Angioni, C., Geisslinger, G., Lütjohann, D., and Brüne, B. (2018) A novel function for 15-lipoxygenases in cholesterol homeostasis and CCL17 production in human macrophages. *Front. Immunol.* **9**, 1906
- Kutzner, L., Goloshchapova, K., Heydeck, D., Stehling, S., Kuhn, H., and Schebb, N. H. (2017) Mammalian ALOX15 orthologs exhibit pronounced dual positional specificity with docosaheptaenoic acid. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1862**, 666–675
- Mazaleuskaya, L. L., Lawson, J. A., Li, X., Grant, G., Mesaros, C., Crosser, T., Blair, I. A., Ricciotti, E., and FitzGerald, G. A. (2016) A broad-spectrum lipidomics screen of antiinflammatory drug combinations in human blood. *JCI Insight* **1**, e87031
- Carter, G. W., Young, P. R., Albert, D. H., Bouska, J., Dyer, R., Bell, R. L., Summers, J. B., and Brooks, D. W. (1991) 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**, 929–937
- Gillard, J., Ford-Hutchinson, A. W., Chan, C., Charleson, S., Denis, D., Foster, A., Fortin, R., Leger, S., McFarlane, C. S., Morton, H., Piechuta, H., Riendeau, D., Rouzer, C. A., Rokach, J., Young, R., MacIntyre, D. E., Peterson, L., Bach, T., Eiermann, G., Hopple, S., Humes, J., Hupe, L., Luell, S., Metzger, J., Meurer, R., Miller, D. K., Opas, E., and Pacholok, S. (1989) L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butylthio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **67**, 456–464
- Archambault, A. S., Turcotte, C., Martin, C., Provost, V., Larose, M. C., Laprise, C., Chakir, J., Bissonnette, É., Lavolette, M., Bossé, Y., and Flamand, N. (2018) Comparison of eight 15-lipoxygenase (LO) inhibitors on the biosynthesis of 15-LO metabolites by human neutrophils and eosinophils. *PLoS One* **13**, e0202424
- Isobe, Y., Arita, M., Matsueda, S., Iwamoto, R., Fujihara, T., Nakanishi, H., Taguchi, R., Masuda, K., Sasaki, K., Urabe, D., Inoue, M., and Arai, H. (2012) Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvins E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid. *J. Biol. Chem.* **287**, 10525–10534
- Seno, K., Okuno, T., Nishi, K., Murakami, Y., Watanabe, F., Matsuura, T., Wada, M., Fujii, Y., Yamada, M., Ogawa, T., Okada, T., Hashizume, H., Kii, M., Hara, S., Hagishita, S., Nakamoto, S., Yamada, K., Chikazawa, Y., Ueno, M., Teshirogi, I., Ono, T., and Ohtani, M. (2000) Pyrrolidine inhibitors of human cytosolic phospholipase A(2). *J. Med. Chem.* **43**, 1041–1044
- Khanapure, S. P., Garvey, D. S., Janero, D. R., and Letts, L. G. (2007) Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 311–340
- Werz, O., and Steinhilber, D. (2005) Development of 5-lipoxygenase inhibitors—lessons from cellular enzyme regulation. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 327–333
- Funck, C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871–1875
- Fukunaga, K., Kohli, P., Bonnans, C., Fredenburgh, L. E., and Levy, B. D. (2005) Cyclooxygenase 2 plays a pivotal role in the resolution of acute lung injury. *J. Immunol.* **174**, 5033–5039
- Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M., and Teixeira, M. M. (2016) Resolution of inflammation: what controls its onset? *Front. Immunol.* **7**, 160
- Lehmann, C., Homann, J., Ball, A. K., Blöcher, R., Kleinschmidt, T. K., Basavarajappa, D., Angioni, C., Ferreirós, N., Häfner, A. K., Rådmark, O., Proschak, E., Haeggström, J. Z., Geisslinger, G., Parnham, M. J., Steinhilber, D., and Kahnt, A. S. (2015) Lipoxin and resolvins biosynthesis is dependent on 5-lipoxygenase activating protein. *FASEB J.* **29**, 5029–5043
- Levy, B. D., Clish, C. B., Schmidt, B., Gronert, K., and Serhan, C. N. (2001) Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat. Immunol.* **2**, 612–619
- Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B., and Lipsky, P. E. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* **12**, 1063–1073
- Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M. J., and Willoughby, D. A. (1999) Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat. Med.* **5**, 698–701
- Wallace, J. L., McKnight, W., Reuter, B. K., and Vergnolle, N. (2000) NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology* **119**, 706–714
- Ajuebor, M. N., Singh, A., and Wallace, J. L. (2000) Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in

- experimental colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**, G238–G244
43. Burnett, B. P., and Levy, R. M. (2012) 5-Lipoxygenase metabolic contributions to NSAID-induced organ toxicity. *Adv. Ther.* **29**, 79–98
  44. Lämmermann, T., Afonso, P. V., Angermann, B. R., Wang, J. M., Kastenmüller, W., Parent, C. A., and Germain, R. N. (2013) Neutrophil swarms require LTB<sub>4</sub> and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature* **498**, 371–375
  45. Rådmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., and Samuelsson, B. (2015) 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 331–339
  46. Levy, B. D., De Sanctis, G. T., Devchand, P. R., Kim, E., Ackerman, K., Schmidt, B. A., Szczeklik, W., Drazen, J. M., and Serhan, C. N. (2002) Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A<sub>4</sub>. *Nat. Med.* **8**, 1018–1023
  47. Bhavsar, P. K., Levy, B. D., Hew, M. J., Pfeffer, M. A., Kazani, S., Israel, E., and Chung, K. F. (2010) Corticosteroid suppression of lipoxin A<sub>4</sub> and leukotriene B<sub>4</sub> from alveolar macrophages in severe asthma. *Respir. Res.* **11**, 71
  48. Serhan, C. N., and Savill, J. (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**, 1191–1197
  49. Gilbert, N. C., Bartlett, S. G., Waight, M. T., Neau, D. B., Boeglin, W. E., Brash, A. R., and Newcomer, M. E. (2011) The structure of human 5-lipoxygenase. *Science* **331**, 217–219
  50. Fischer, L., Steinhilber, D., and Werz, O. (2004) Molecular pharmacological profile of the nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor CJ-13,610. *Br. J. Pharmacol.* **142**, 861–868
  51. Fischer, L., Szellas, D., Rådmark, O., Steinhilber, D., and Werz, O. (2003) Phosphorylation- and stimulus-dependent inhibition of cellular 5-lipoxygenase activity by nonredox-type inhibitors. *FASEB J.* **17**, 949–951
  52. Gerstmeier, J., Weinigel, C., Rummeler, S., Rådmark, O., Werz, O., and Garscha, U. (2016) Time-resolved in situ assembly of the leukotriene-synthetic 5-lipoxygenase/5-lipoxygenase-activating protein complex in blood leukocytes. *FASEB J.* **30**, 276–285
  53. Fredman, G., Ozcan, L., Spolitu, S., Hellmann, J., Spite, M., Backs, J., and Tabas, I. (2014) Resolvin D1 limits 5-lipoxygenase nuclear localization and leukotriene B<sub>4</sub> synthesis by inhibiting a calcium-activated kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 14530–14535
  54. Titos, E., Clària, J., Planagumà, A., López-Parra, M., González-Pérez, A., Gaya, J., Miquel, R., Arroyo, V., and Rodés, J. (2005) Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein abrogates experimental liver injury: role of Kupffer cells. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 871–878
  55. Serhan, C. N., Dalli, J., Colas, R. A., Winkler, J. W., and Chiang, N. (2015) Protectins and maresins: new pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 397–413
  56. Serhan, C. N., Yang, R., Martinod, K., Kasuga, K., Pillai, P. S., Porter, T. F., Oh, S. F., and Spite, M. (2009) Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J. Exp. Med.* **206**, 15–23
  57. Feltenmark, S., Gautam, N., Brunnström, A., Griffiths, W., Backman, L., Edenius, C., Lindbom, L., Björkholm, M., and Claesson, H. E. (2008) Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 680–685
  58. Serhan, C. N., Chiang, N., and Van Dyke, T. E. (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 349–361
  59. Kim, S. N., Akindehin, S., Kwon, H. J., Son, Y. H., Saha, A., Jung, Y. S., Seong, J. K., Lim, K. M., Sung, J. H., Maddipati, K. R., and Lee, Y. H. (2018) Anti-inflammatory role of 15-lipoxygenase contributes to the maintenance of skin integrity in mice. *Sci. Rep.* **8**, 8856
  60. Meng, H., McClendon, C. L., Dai, Z., Li, K., Zhang, X., He, S., Shang, E., Liu, Y., and Lai, L. (2016) Discovery of novel 15-lipoxygenase activators to shift the human arachidonic acid metabolic network toward inflammation resolution. *J. Med. Chem.* **59**, 4202–4209
  61. Leslie, C. C. (2015) Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>: physiological function and role in disease. *J. Lipid Res.* **56**, 1386–1402
  62. Shikano, M., Masuzawa, Y., Yazawa, K., Takayama, K., Kudo, I., and Inoue, K. (1994) Complete discrimination of docosahexaenoate from arachidonate by 85 kDa cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> during the hydrolysis of diacyl- and alkenylacylglycerophosphoethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 211–216
  63. Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y., Sato, H., Shimo, K., Kobayashi, T., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakanishi, H., Ikeda, K., Taguchi, R., Kabashima, K., Arita, M., Arai, H., Lambeau, G., Bollinger, J. M., Hara, S., Gelb, M. H., and Murakami, M. (2013) Lymphoid tissue phospholipase A<sub>2</sub> group IID resolves contact hypersensitivity by driving antiinflammatory lipid mediators. *J. Exp. Med.* **210**, 1217–1234

Received for publication November 22, 2018.

Accepted for publication January 15, 2019.

### 3.3 Manuskript III

---

#### **Communication between human macrophages and epithelial cancer cell lines dictates lipid mediator biosynthesis**

Markus Werner<sup>\*</sup>, Simona Pace<sup>\*</sup>, Anna Czapka, Paul M. Jordan, Jana Gerstmeier, Andreas Koeberle, Oliver Werz

**Cellular and Molecular Life Sciences**, 2020 (published online, printed version in progress)

---

Hier untersuchten wir, wie die Interaktion von Tumor-assoziierten-/M2-ähnlichen-Makrophagen (TAM/M2) und Krebszellen die jeweilige Biosynthesekapazität für verschiedene Lipidmediatoren (LM) beeinflusst. Wir konnten zeigen, dass allein die zellkontaktlose Kommunikation von epithelialen Krebszellen (A549, HT-29) und TAM/M2 zu einer potenziell krebsfördernden Tumormikroumgebung, die reich an Leukotrienen und Prostaglandinen ist, beitragen kann. Für die Kokultur mit den A549-Lungenkrebszellen untersuchten wir die mechanistischen Hintergründe genauer. Eine vorherige 48-Stunden-Kokultur erhöhte die Leukotrienbildungskapazität der Makrophagen stark. Die kokultivierten Immunzellen reagierten auf eine (bakteriell-induzierte) LM-Stimulation wesentlich sensitiver als die monokultivierten Kontrollen. Das Phosphorylierungs-Ausmaß von p38 MAPK (p38-Mitogen-aktivierte Protein Kinase) und der nachgeschalteten Kinase MAPKAPK-2 (MAPK-aktivierte Proteinkinase 2), welche die 5-LO phosphoryliert und so deren Produktbildung erhöhen kann, war während der Stimulation stark erhöht. Dementsprechend verhinderte der selektive p38 MAPK-Inhibitor Skepinone-L selektiv die erhöhte 5-LO-Produktbildung. Außerdem steigerten die Makrophagen die COX-2-Proteinexpression und die Prostaglandinbildungskapazität der epithelialen Krebszellen.

**Eigenanteil:** Kultivierung von Makrophagen und Krebszellen. Etablierung der Boyden Kammer-Kokultur. Experimentelles Design und Durchführung der LM-Analytik, des Großteils der Western Blot basierten Proteinbestimmungen sowie des Calcium- und Immunfluoreszenz-Imaging. Datenanalyse und Mitwirken bei der Erstellung des Manuskriptes.

**Relativer Gesamtanteil: 75%**

## ORIGINAL ARTICLE



# Communication between human macrophages and epithelial cancer cell lines dictates lipid mediator biosynthesis

Markus Werner<sup>1</sup> · Simona Pace<sup>1</sup> · Anna Czapka<sup>1</sup> · Paul M. Jordan<sup>1</sup> · Jana Gerstmeier<sup>1</sup> · Andreas Koeberle<sup>1,2</sup> · Oliver Werz<sup>1</sup> Received: 9 August 2019 / Revised: 1 November 2019 / Accepted: 4 December 2019  
© Springer Nature Switzerland AG 2020**Abstract**

In tumors, cancer cells coexist and communicate with macrophages that can promote tumorigenesis via pro-inflammatory signals. Lipid mediators (LMs), produced mainly by cyclooxygenases (COXs) or lipoxygenases (LOs), display a variety of biological functions with advantageous or deleterious consequences for tumors. Here, we investigated how the communication between human monocyte-derived M2-like macrophages (MDM) and cancer cells affects LM biosynthesis using LM metabololipidomics. Coculture of human MDM with human A549 epithelial lung carcinoma cells, separated by a semi-permeable membrane, increased LM formation by MDM upon subsequent activation. Strongest effects were observed on 5-LO-derived LM. While expression of the 5-LO pathway was not altered, p38 MAPK and the downstream MAPKAPK-2 that phosphorylates and stimulates 5-LO were more susceptible for activation in MDM upon precedent coculture with A549 cells as compared to monocultures. Accordingly, the p38 MAPK inhibitor Skepinone-L selectively prevented this increase in 5-LO product formation. Also, 5-LO-/15-LO-derived LM including lipoxin A<sub>4</sub>, resolvins D2 and D5 were elevated after coculture with A549 cells, correlating to increased 15-LO-1 protein levels. In contrast to cancer cells, cocubation with non-transformed human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) did not affect LM production in MDM. Vice versa, MDM increased COX-2 protein expression and COX-mediated prostanoid formation in cancer cells. Conclusively, our data reveal that the communication between MDM and cancer cells can strikingly modulate the biosynthetic capacities to produce bioactive LM with potential relevance for tumor biology.

**Keywords** Cyclooxygenase · Lipoxygenase · Leukotrienes · Prostaglandins · Specialized pro-resolving mediators**Abbreviations**

AA	Arachidonic acid
COX	Cyclooxygenase
cPLA <sub>2</sub> -α	Cytosolic phospholipase A <sub>2</sub> -α

Markus Werner and Simona Pace contributed equally.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03413-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.✉ Simona Pace  
simona.pace@uni-jena.de✉ Oliver Werz  
oliver.werz@uni-jena.de<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical/Medicinal Chemistry,  
Institute of Pharmacy, Friedrich-Schiller-University,  
Philosophenweg 14, 07743 Jena, Germany<sup>2</sup> Michael Popp Research Institute, University of Innsbruck,  
Mitterweg 24, 6020 Innsbruck, Germany

DHA	Docosahexaenoic acid
EPA	Eicosapentaenoic acid
ERK-1/2	Extracellular signal-regulated protein kinase-1/2
FCS	Fetal calf serum
FLAP	5-Lipoxygenase-activating protein
HETE	Hydroxyeicosatetraenoic acid
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
LM	Lipid mediator
LO	Lipoxygenase
LT	Leukotriene
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MK-2	MAPKAPK-2, mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2
MDM	Monocyte-derived macrophages
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
PG	Prostaglandin
SPM	Specialized pro-resolving mediators
TAM	Tumor-associated macrophages

Published online: 01 January 2020

Springer



TME Tumor microenvironment  
 UPLC-MS-MS Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

## Introduction

Tumors are composed of different cell types that are exposed to a variety of bioactive mediators, which together form the tumor microenvironment (TME) [1]. Besides cancer cells, endothelial cells, and fibroblasts, also immune cells, particularly tumor-associated macrophages (TAM), occur in tumors [2–4]. Macrophages can accumulate in tumors by proliferation from precursors that are resident in tissues or by trafficking from bone-marrow undergoing differentiation towards mature macrophages [2, 4]. Once in tumors, these recruited macrophages can adopt a tumor-supporting subtype secreting cytokines, chemokines and other bioactive mediators that induce immunosuppression, angiogenesis, tumor growth, and metastasis [2]. Macrophages can adopt a wide spectrum of phenotypes where simplified extremes can be divided into “anti-tumoral” M1 and “pro-tumoral” M2 [5]. TAM usually display a M2-like phenotype, and higher M2-like TAM infiltration correlates with poor prognosis [3, 6].

Lipid mediators (LM) comprise different classes of bioactive lipids that act as local hormones mediating their multiple actions via cognate G-protein-coupled receptors [7]. The majority of LM that are derived from polyunsaturated fatty acids are generated by stereospecific oxygenation via cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LO) pathways and play crucial roles in acute and chronic inflammation [8]. While COX-1/2 convert arachidonic acid (AA; 20:4  $\omega$ -6) to initialize the biosynthesis of pro-inflammatory prostanoids, particularly prostaglandin (PG)E<sub>2</sub>, the 5-LO pathway leads to formation of leukotrienes (LT) from AA that possess inflammatory properties, too [9]. In contrast, the novel superfamily of so-called specialized pro-resolving mediators (SPM) are generated from docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), mainly involving 12-/15-LOs that act in conjunction with 5-LO, and possess anti-inflammatory features by actively terminating inflammatory responses and by promoting the resolution of inflammation [10, 11].

Unresolved inflammation is a well-recognized hallmark of cancer, and chronic inflammatory diseases can increase the risk for cancers [12, 13], while drugs interfering with inflammation, e.g., non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), are chemopreventive [14, 15]. NSAIDs mediate their anti-inflammatory effects by inhibiting COX-mediated prostanoid formation, and along these lines, PG as well as LT orchestrate the complex interactions between cancer cells and the surrounding stromal cells in tumors in relation to

tumor progression and metastasis [16, 17]. 5-LO and COX-2 are known to be overexpressed in several cancers including lung, colon, breast, prostate, and pancreas, and LT and PG are commonly elevated in tumors with obvious roles in tumorigenesis and metastasis [17–19]. Indeed, cancer patients with increased COX-2 levels in their tumors exhibit decreased survival rates [17, 18], and genetic or pharmacological inhibition of 5-LO in neutrophils abrogated lung colonization of metastasis-initiating breast cancer [20]. In contrast, SPM suppress tumor growth [21] and stimulate resolution in cancer by enhancing endogenous clearance of tumor cell debris [22].

The cancer lipidome is rather diverse and may obviously promote but also inhibit cancer pathogenesis [15]. In the tumor, cancer cells and TAM as well as other stromal cells coexist and communicate with each other, leading to specific alterations in the LM signature profiles compared to those of cells in healthy tissues [23, 24]. Tumor-specific LM profiles are caused on one hand by coordinated transcellular LM biosynthesis by the multiple cell types and enzymes involved [25] but also by aberrant expression of LM-biosynthetic enzymes due to cancer cell-stromal cell interactions within the TME [17]. Here, we designed a coculture system of cancer cells and human TAM-like monocyte-derived macrophages (MDM) without direct contacts between the cells to study how their humoral communication influences LM biosynthesis pathways in each cell type.

## Materials and methods

### Cells, cell isolation, and differentiation of monocyte-derived macrophages

The human acute promyelocytic leukemia cell line HL-60 (ATCC) was cultured in RPMI-1640 (GE Healthcare Life Sciences, South Logan, UT) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 2 mmol/l (L-glutamine), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100  $\mu$ g/ml) in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

Human epithelial lung carcinoma A549 cells (ATCC) and human colon cancer HT-29 cells (ATCC) were cultured in DMEM (Biochrom/Merck, Berlin, Germany) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FCS, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100  $\mu$ g/ml) in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were isolated from human umbilical cords and cultured in “Endothelial Cell Basal Medium MV” supplemented with “Endothelial Cell Growth Medium MV2 SupplementMix” (PromoCell, Heidelberg, Germany) for up to four passages as described previously [26]. Donors were informed about the aim of the study and gave written informed consent.

Monocytes were isolated from leukocyte concentrates derived from freshly withdrawn peripheral venous blood of healthy adult (18–65 years) human donors (Institute of Transfusion Medicine, University Hospital Jena, Germany). The experimental protocol was approved by the ethical committee of the University Hospital Jena, and all methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using dextran sedimentation and Ficoll-Histopaque 1077-1 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) centrifugation. Monocytes were obtained from PBMC by adherence to cell culture flasks (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) for 1.5 h (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 supplemented with 1 mM Ca<sup>2+</sup> and 0.5 mM Mg<sup>2+</sup>, followed by removing non-adherent cells and adding fresh medium (RPMI 1640 containing 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated FCS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). For differentiation towards TAM-like macrophages, monocytes were first incubated with 20 ng/ml macrophage colony-stimulating factor (M-CSF; PeproTech, Hamburg, Germany) for 6 days, followed by so-called alternative activation using 20 ng/ml interleukin (IL)-4 (PeproTech) for additional 48 h [27].

Cocultures of cancer cells or HUVECs with MDM were performed in a Boyden chamber system composed of 6-well plates—advanced TC (Greiner Bio-One) as lower compartment, and Falcon Cell Culture inserts with 0.4 µm pore size (VWR International, Darmstadt, Germany) as upper compartment. Cancer cells or HUVECs were seeded in the lower compartment (2 × 10<sup>6</sup> cells in 2 ml medium). After 2 h, inserts were installed on top of the wells, immediately followed by addition of MDM (2 × 10<sup>6</sup> cells/ml) to the other compartment. Both compartments received RPMI-1640 containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin for cocultures with cancer cell lines or “Endothelial Cell Growth Medium” including “SupplementalMix” for HUVEC cocultures. After 2 h, IL-4 (20 ng/ml) was added to the Boyden chamber system with access to both compartments. Cells were cocultured (or monocultured in case of controls) for another 48 h. Then, cell populations were separated from each other for conducting further analysis.

### Incubations of MDM, cancer cells or HUVEC and LM metabololipidomics

The different cell types from the Boyden chamber cocultures were separated from each other. MDM, cancer cells or HUVECs (2 × 10<sup>6</sup> cells) were incubated in 2 ml of PBS pH 7.4 containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>. For experiments using Skepinone-L (0.3 µM) the test compound or vehicle (0.1% DMSO) were applied 15 min prior stimulation. Cells were exposed to *E. coli* (serotype O6:K2:H1) at a ratio of 1:50

(human cells:*E. coli*) for 90 min at 37 °C or activated by Ca<sup>2+</sup>-ionophore A23187 (0.5 µM) for 10 min at 37 °C, as indicated. After the incubation, the supernatants (2 ml) were removed from the cells and transferred to 3 ml of ice-cold methanol containing 10 µl of deuterium-labeled internal standards (200 nM d<sub>8</sub>-5S-HETE, d<sub>4</sub>-LTB<sub>4</sub>, d<sub>5</sub>-LXA<sub>4</sub>, d<sub>5</sub>-RvD2, d<sub>4</sub>-PGE<sub>2</sub>, and 10 µM d<sub>8</sub>-AA) for quantification of generated LM. Deuterated and non-deuterated LM standards were purchased from Cayman Chemical/Biomol (Hamburg, Germany).

For experiments with MDM homogenates, cells in PBS pH 7.4 were scraped in the presence of 1 mM EDTA, counted, aliquoted (0.8 × 10<sup>6</sup> cells/ml) and sonified (3 × 15 s) on ice to lyse the cells. To these homogenates 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 2 µM AA was added and samples were incubated for 10 min at 37 °C to induce LM formation. The reaction was stopped by addition of 2 ml of ice-cold methanol containing 10 µl of deuterium-labeled internal standards (see above).

Sample preparation for ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS) analysis of fatty acid substrates and LM from intact cells and homogenates was performed as reported [28]. In brief, samples were kept at −20 °C for 60 min to allow protein precipitation, centrifuged (1200 g, 4 °C, 10 min), 9 ml acidified H<sub>2</sub>O (pH 3.5) was added, and LM were separated by solid phase extraction. Solid phase cartridges (Sep-Pak® Vac 6 cc 500 mg/6 ml C18; Waters, Milford, MA) were equilibrated with 6 ml methanol and 2 ml H<sub>2</sub>O prior sample loading onto columns. After washing with 6 ml H<sub>2</sub>O and additional 6 ml *n*-hexane, LM were eluted using 6 ml methyl formate. Finally, samples were brought to dryness using an evaporation system (TurboVap LV, Biotage, Uppsala, Sweden) and resuspended in 100 µl methanol–water (50/50, v/v) for UPLC-MS-MS automated injections. LM profiles were analyzed by means of an Acquity™ UPLC system (Waters, Milford, MA) and a QTRAP 5500 Mass Spectrometer (ABSciex, Darmstadt, Germany) equipped with a Turbo V™ Source and electrospray ionization (ESI) as reported [28]. Briefly, LM were separated using an ACQUITY UPLC® BEH C18 column (1.7 µm, 2.1 × 100 mm; Waters, Eschborn, Germany) at 50 °C with methanol–water–acetic acid of 42:58:0.01 (v/v/v) at a flow rate of 0.3 ml/min that was ramped to 86:14:0.01 (v/v/v) over 12.5 min and then to 98:2:0.01 (v/v/v) for 3 min. The QTrap 5500 was operated in negative ionization mode using scheduled multiple reaction monitoring (MRM) coupled with information-dependent acquisition. The scheduled MRM window was 60 s, optimized LM parameters were adopted [28], and the curtain gas pressure was set to 35 psi. The retention time and at least six diagnostic ions for each LM were confirmed by means of an external standard (Cayman Chemical/Biomol). Quantification was achieved by calibration curves for each LM. Linear calibration curves were obtained for each LM and yielded *r*<sup>2</sup>

values of 0.998 or higher. Additionally, the limit of detection for each targeted LM was determined [28].

### Flow cytometry

Fluorescent staining for flow cytometric analysis of MDM was performed in FACS buffer (PBS pH 7.4 containing 0.5% bovine serum albumin (BSA), 2 mM EDTA and 0.1% sodium azide). Non-specific antibody binding was blocked using mouse serum (10 min at 4 °C) prior to staining with antibodies. Then, MDM were stained with fluorochrome-labelled antibody mixtures (20 min at 4 °C). The following antibodies were used: FITC anti-human CD14 (clone M5E2), APC-H7 anti-human CD80 (clone L307.4, BD Bioscience, San Jose, CA), PE-Cy7 anti-human CD163 (clone RM3/1, Biolegend, San Diego, CA), APC anti-human VSIG-4 (clone JAV4), PerCP-eFluor710 anti-human CD206 (clone 19.2, eBioscience, San Diego, CA). Cells were resuspended in 300 µL FACS buffer containing propidium iodide staining solution (40 ng/test, eBioscience, San Diego, CA) to determine viability. Upon staining, MDM were analyzed using a FACS Canto Plus flow cytometer (BD Bioscience). FlowJo X Software (BD Bioscience) was used for data analysis.

### Immunofluorescence microscopy

MDM ( $2 \times 10^6$  cells) were seeded onto glass coverslips in a 6-well plate (bottom compartment of Boyden chambers) and cultured for 48 h with or without A549 cells ( $2 \times 10^6$  cells; upper compartment) in presence of IL-4. MDM were separated from A549 cells, and *E. coli* (ratio 1:50, MDM:*E. coli*) or vehicle (PBS) were added at 37 °C. After 90 min incubation cells were fixed with 4% paraformaldehyde solution. Acetone (5 min, 4 °C) followed by 0.25% Triton X-100 for 10 min at RT was used for permeabilization before blocking with normal goat serum 10% (50062Z, Thermo Fisher). Samples were incubated with mouse monoclonal anti-5-LO antibody, 1:100 (6A12 AB, 250 µg/ml; kindly provided by Dr. Dieter Steinhilber, Goethe-University-Frankfurt, Frankfurt, Germany) and rabbit polyclonal antibodies against 5-LO-activating protein (FLAP), 5 µg/ml (ab85227, Abcam, Cambridge, UK), or mouse monoclonal anti-15-LO-1 antibody, 1:100 (ab119774, Abcam) and rabbit anti-5-LO antibody, 1:100 (1550 AK6, kindly provided by Dr. Olof Radmark, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden) at 4 °C overnight. 5-LO, 15-LO-1 and FLAP were stained with the fluorophore-labeled secondary antibodies: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), 1:500 (A11034, Thermo Fisher) and Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG (H+L), 1:500 (A21424, Thermo Fisher). Nuclear DNA was stained with ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (15395816, Thermo Fisher). Samples were analyzed by a Zeiss Axiovert

200 M microscope, and a Plan Neofluar  $\times 40/1.30$  Oil (DIC III) objective (Carl Zeiss, Jena, Germany). An AxioCam MR camera (Carl Zeiss) was used for image acquisition.

### SDS-PAGE and Western blot

Cell lysates of MDM ( $2 \times 10^6$  cells) were separated on 10% (5-LO, 15-LO-1, 15-LO-2, COX-2, cPLA<sub>2</sub>-α, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), phospho-p38 MAPK, extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)-1/2, phospho-ERK-1/2), phospho-mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2 (MAPKAPK-2, MK-2) and 16% (FLAP) polyacrylamide gels, and blotted onto nitrocellulose membranes (Amersham™ Protran Supported 0.45 µm nitrocellulose, GE Healthcare, Freiburg, Germany). Membranes were incubated with the following primary antibodies: rabbit polyclonal anti-5-LO, 1:1000 (by Genscript, Piscataway to a peptide with the C-terminal 12 amino acids of 5-LO: CSPDRIPNSVA; kindly provided by Dr. Marcia E. Newcomer, Louisiana State University, LA); mouse monoclonal anti-15-LO-1, 1:500 (ab119774, Abcam); rabbit polyclonal anti-15-LO-2, 1:200 (ab23691, Abcam); rabbit polyclonal anti-COX-2, 1:500 (4842, Cell Signaling, Danvers, MA); rabbit polyclonal anti-cPLA<sub>2</sub>-α, 1:1000 (2832, Cell Signaling); rabbit monoclonal anti-p38 MAPK, 1:1000 (8690, Cell Signaling); rabbit polyclonal anti-phospho-p38 MAPK, 1:1000 (9211, Cell Signaling); rabbit monoclonal anti-ERK-1/2, 1:1000 (4695, Cell Signaling); mouse monoclonal anti-phospho-ERK-1/2, 1:750 (9106, Cell Signaling); rabbit monoclonal anti-phospho-MK-2, 1:1000, (3316, Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-FLAP, 1:1000 (ab85227, Abcam); mouse monoclonal anti-β-actin, 1:1000 (3700, Cell Signaling); and rabbit monoclonal anti-GAPDH, 1:1000 (5174, Cell Signaling). Immunoreactive bands were stained with IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H+L), 1:15,000 (926 32211, LI-COR Biosciences) and/or IRDye 680LT Goat anti-Mouse IgG (H+L), 1:40,000 (926-68020, LI-COR Biosciences), and visualized by an Odyssey infrared imager (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). Data from densitometric analysis were background corrected.

### Ca<sup>2+</sup> imaging

MDM ( $2 \times 10^6$  cells) were detached by scraping in the presence of 1 mM EDTA. Cells were centrifuged and resuspended in HEPES-buffer (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>  $\times 7$  H<sub>2</sub>O, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucose, 20 mM HEPES pH 7.4) containing 1 µM Fura-2-AM and kept for 30 min at 37 °C in the dark. Then, cells were washed and resuspended in HEPES-buffer containing 0.1% fatty acid-free BSA at a density of  $0.75 \times 10^6$ /ml. 200 µl of the cell suspension were transferred into a 96-well plate and 1 mM CaCl<sub>2</sub> was added. After 10 min,

*E. coli* (MDM:*E. coli* = 1:50) or vehicle (PBS) was added. The signal was monitored in a thermally (37 °C) controlled NOVOstar microplate reader [BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany; emission at 510 nm, excitation at 340 nm ( $\text{Ca}^{2+}$ -bound Fura-2) and 380 nm (free Fura-2)]. After cell lysis with Triton X-100 the maximal fluorescence signals were monitored, and after chelating  $\text{Ca}^{2+}$  with 20 mM EDTA the minimal fluorescence signals were recorded. The ratio of signals obtained with Triton X-100 subtracted by the signals obtained at basal fluorescence intensity (shown as  $\Delta\text{ratio}$ ) of each experiment was set to 100%.  $\text{Ca}^{2+}$ -influx was calculated by determining the area under the curve (AUC) for  $\Delta\text{ratio}$  of *E. coli* stimulation subtracted by AUC of PBS-control ( $\text{AUC}_{E.coli} - \text{AUC}_{\text{PBS}}$ ) after 90 min.

### Statistical analysis

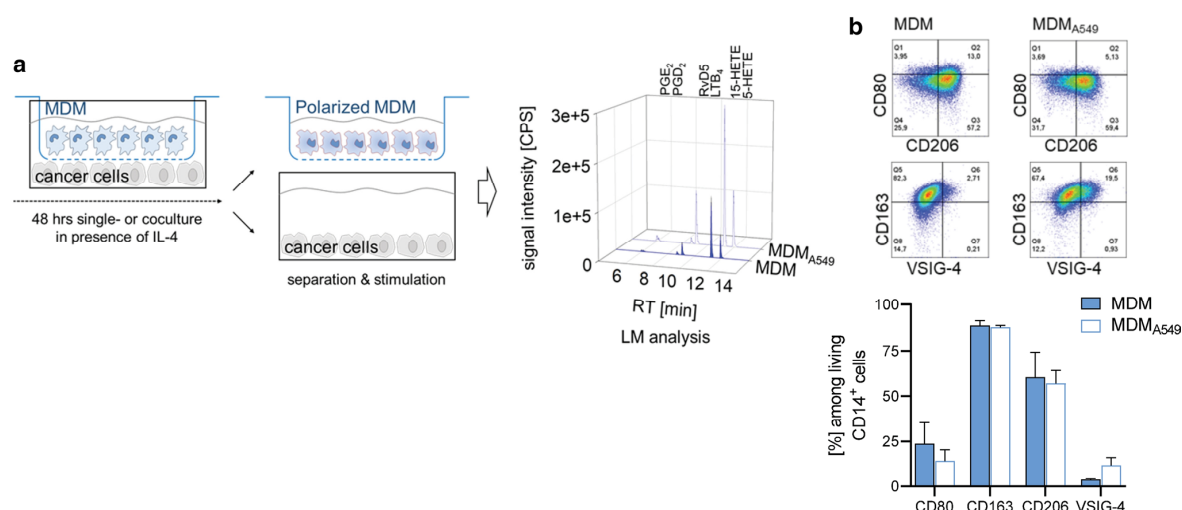
The sample size for experiments was chosen empirically based on previous studies [27, 29] to ensure adequate statistical power. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M) of *n* observations, where *n* represents the number of experiments with cells from separate donors, performed on different days in triplicates or duplicates, as indicated. Analysis of data were conducted using Graph-Pad Prism 8 software (San Diego, CA). T-test was used for comparison of two groups. Two-way ANOVA was used for statistical analysis in case of two different categorical independent variables influence one continuous dependent

variable, as indicated. The criterion for statistical significance is  $P < 0.05$ .

## Results

### Coculture of MDM during alternative activation with A549 cells primes for elevated LM biosynthesis

In vitro, M2-like TAM can be obtained from MDM after differentiation of blood monocytes with M-CSF and subsequent alternative activation with Th2-related IL-4 [30]. Human monocytes were first differentiated with M-CSF for 6 days to obtain mature MDM, which were then treated with IL-4 for 48 h towards TAM/M2-like MDM in the absence (“MDM”) or presence of the human alveolar basal epithelial cancer cell line A549 (“MDM<sub>A549</sub>”) in trans-well Boyden chambers. Under these conditions, the two cell types are able to communicate via secreted molecules but without direct cell–cell contacts (Fig. 1a). After separation from A549 cells, the MDM were analyzed by flow cytometry for expression of surface markers that are characteristic for TAM/M2-like macrophage phenotypes. In agreement with the literature [30], the M2-markers CD163 and CD206 are strongly expressed in MDMs when treated with IL-4 in contrast to the M1-like markers CD80 and V-set immunoglobulin-domain-containing 4 (VSIG-4), a B7 family-related protein that is expressed by resting macrophages [31]. Cocultivation with



**Fig. 1** MDM-cancer cell cocultivation system without direct cell–cell contacts. **a** Using a Boyden chamber, MDM are cocultured with cancer cells, separated by a semipermeable membrane to avoid cell–cell contacts, in the presence of IL-4 for 48 h. Then, the MDM and cancer cells are separately challenged with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50) for another 90 min. LM released into the supernatants were analyzed via UPLC-MS/MS reflected by the chromatograms (retention times:

PGE<sub>2</sub>, 6.0 min; RVD5, 8.8 min; LTB<sub>4</sub>, 9.2 min; 15-HETE, 11.4 min; 5-HETE 12.0 min). **b** Effect of A549 cancer cells on IL-4-polarized MDM phenotypic surface markers. Expression of surface markers CD80, CD206, CD163 and VSIG-4 were determined by flow cytometry; representative pseudocolor dot plots from *n* = 3 separate donors; quantification is given as bar charts, data are means  $\pm$  S.E.M



A549 cells during IL-4 treatment was without substantial effect on the expression of CD163 and CD206 on MDM, while CD80 expression was slightly decreased and VSIG-4 expression increased (Fig. 1b).

Alternative activation of human MDM by IL-4 is strikingly associated with the expression of phenotype-specific LM-biosynthetic pathways [27, 28, 32]. Exposure of IL-4-activated macrophages by an appropriate stimulus such as pathogenic bacteria (e.g., *E. coli*) induces the generation of broad spectrum bioactive LM [27, 28]. These LM encompass pro-tumoral COX-derived PG and 5-LO-derived LT and 5-HETE [16–18] but also anti-tumoral SPM that suppress tumor growth [21] and stimulate resolution in cancer [22]. Note that besides pathogenic bacteria, other relevant stimuli, in particular related to cancer, failed to induce substantial and broad spectrum LM formation in M2 macrophages in vitro [27], although this macrophage subtype is considered as a major source of LM in vivo. Coincubation with A549 cells during MDM activation by IL-4 for 48 h strongly elevated that capacity of the MDM to produce bioactive 5-LO products (e.g., LTB<sub>4</sub> and 5-HETE) upon subsequent activation by pathogenic *E. coli* (Fig. 2a, b and Online Resource 1). Also the capacities to generate COX products and 15-LO-derived LM, including SPM, namely RvE3, RvD2 and RvD5, were increased in these MDM due to preceding coculture with A549 cells, however, with lower magnitudes (Fig. 2a). Obviously, LM that require both 5-LO and 15-LO activities such as 5,15-diHETE or LXA<sub>4</sub> were also prominently increased.

To prove that the MDM-modulating effects of the A549 cancer cells are not just the consequence of coculture with any adherent cell-type in an unspecific manner, we used HUVEC which are adherent endothelial cells that produce COX- and LO-derived LM from various fatty acid substrates [33] but are not transformed into cancerous cells. In contrast to A549 cells, cocultivation of MDM with the non-transformed HUVEC failed to increase 5-LO and COX product formation upon subsequent exposure to *E. coli*, except for PGF<sub>2α</sub>. The formation of 15-LO-derived SPM and their monohydroxy precursors was rather impaired due to preceding HUVEC coculture (Fig. 2a). Besides A549 cells, we also coincubated MDM during IL-4 activation with two other cancer cell lines, namely the human colon epithelial cancer cell line HT-29 and promyelocytic leukemia HL60 cells. Coculture with HT-29 increased COX and 5-LO product formation in MDM but without consistent modulation of 15-LO activities. In contrast, HL60 cells failed to promote LM biosynthesis in MDM but rather suppressed it (Fig. 2a). Note that coculture with all three cancer cell lines (A549, HT-29 and HL60) slightly increased the release of free fatty acids (mainly AA) to a similar degree (Fig. 2a). It is therefore unlikely that the pronounced differences in LM profiles originate from altered release of fatty acids as substrates for

LM biosynthesis but are rather due to favorable effects of A549 cells on the enzymatic transformation of the substrates by the LM-biosynthetic enzymes in MDM.

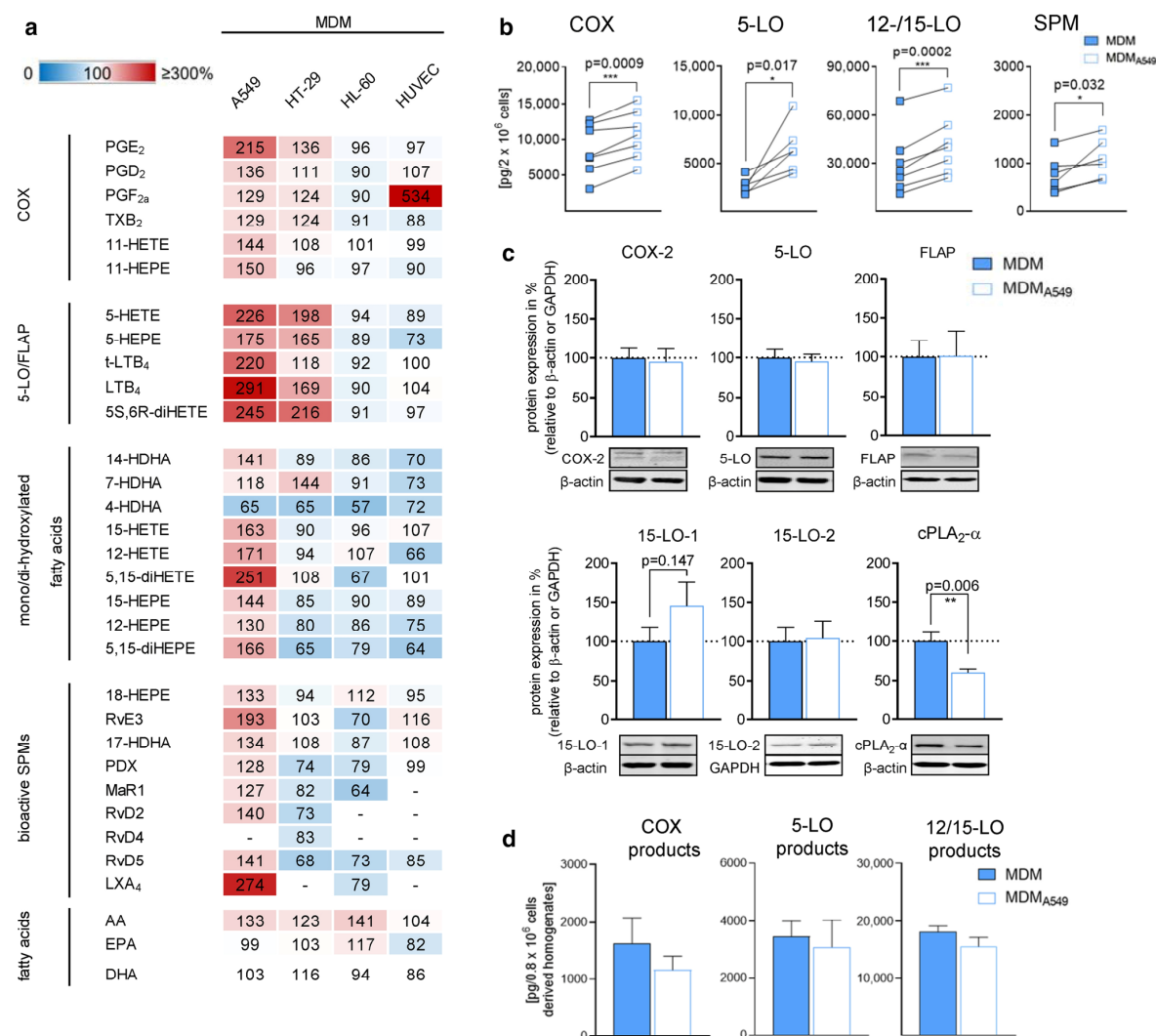
### **Influence of A549 cell coculture on the protein expression of LM-biosynthetic enzymes in MDM**

The increased capacities of IL-4-activated MDM to generate LM due to precedent coculture with A549 cells could be related to higher protein contents of the LM-biosynthetic enzymes. Western blot analysis of total cell lysates of MDM cultivated with IL-4 for 48 h revealed equal protein levels of COX-2, 5-LO and its helper protein FLAP, and 15-LO-2 for cells grown in the absence or presence of A549 cells (Fig. 2c). In agreement with others [34], mPGES-1 was not expressed in these IL-4-treated MDM, and the low levels of COX-1 (not shown) were inconsistently detectable. Surprisingly, the amounts of cPLA<sub>2</sub>-α protein were much reduced when MDM were cocultured with A549 cells as compared to MDM monocultures (Fig. 2c), although the capacity to liberate AA for LM formation was rather elevated under these conditions (see Fig. 2a). On the other hand, for expression of 15-LO-1, a tendency towards higher protein levels was appreciable when MDM were cocultured with A549 (Fig. 2c), which might explain the higher levels of 15-LO products including SPM (see Fig. 2a, b).

In addition, we studied LM production in MDM homogenates prepared by sonification using a well-established cell-free assay [35] as measure for the amounts of enzymatically active COX-2, 5-LO, and 15-LO. Note that under these assay conditions, cellular regulatory mechanisms (e.g., phosphorylation or interaction with helper proteins) are not operative and substrate fatty acids must be supplied exogenously to ensure full activities of the enzymes. In line with the protein expression, the amounts of LM formed by COX-2, 5-LO and 15-LO did not substantially differ between MDM homogenates derived from monocultures and MDM/A549 cocultures (Fig. 2d), which indicates that the amounts of enzymatically active enzymes are comparable. Together, these data suggest that the marked increase of LM in MDM cocultured with A549 is not primarily caused by altered levels of the major LM-biosynthetic enzymes.

### **Coculture of MDM with A549 cells primes for activation of the p38 MAPK/MK-2 pathway that mediates increased 5-LO product synthesis**

The lack of an increase in 5-LO and FLAP protein levels in MDM cocultured with A549 cells suggest that boosting of favorable regulatory mechanisms in the MDM may account for elevated 5-LO-derived LM. Cellular 5-LO activation is complex and depends on multiple factors including elevated intracellular Ca<sup>2+</sup> levels ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), 5-LO subcellular



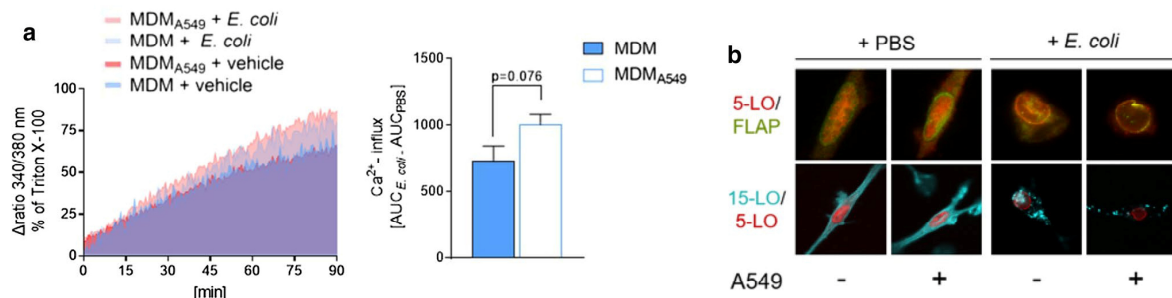
**Fig. 2** Coculture of MDM during alternative activation with A549 cells primes for elevated LM biosynthesis. MDM were cocultured with either A549 cells, HT-29 cells, HL-60 cells or HUVEC in the Boyden chamber (see Fig. 1a) for 48 h in the presence of IL-4. **a, b** MDM were separated and challenged with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio=1:50) for 90 min at 37 °C. LMs were extracted and analyzed by UPLC-MS-MS. **a** Changes in LM formation of MDM after precedent coculture, given in percentage, versus LM produced in MDM after monocultures (=100%, white) upon subsequent exposure to *E. coli*. Data are shown in a heatmap and given as means,  $n=3-7$ . **b** Absolute amounts of LM (COX products, 5-LO products, 12/15-LO products and SPM) produced in MDM after coculture with A549

cells and in MDM after monocultures and subsequent exposure to *E. coli*, each, given in  $\text{pg}/2 \times 10^6$  MDM. Data are means,  $n=6-7$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , two-tailed *t* test. **c** MDM were analyzed for protein expression of COX-2, 5-LO, FLAP, 15-LO-1, 15-LO-2 and cPLA<sub>2</sub>-α, as indicated, by Western blot, normalized to β-actin or GAPDH. Western blots are shown as representatives and data are means  $\pm$  S.E.M.,  $n=7-13$  separate donors; \*\* $P<0.01$ , two-tailed *t* test, monocultures (100%) versus cocultures. **d** MDM in PBS containing 1 mM EDTA were sonified on ice and resulting homogenates, corresponding to  $8 \times 10^5$  cells, were incubated with 2 μM AA and 2 mM CaCl<sub>2</sub> for 10 min at 37 °C. LM were extracted and analyzed by UPLC-MS-MS. Data are means  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$

localization and interaction with FLAP, and phosphorylation of 5-LO by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK, MK)-2 and ERK-1/2 [36].

First, we analyzed the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in MDM upon exposure to *E. coli* which was shown to be elevated under such

conditions leading to LM formation [27]. Preceding coculture with A549 cells slightly increased the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in MDM exposed to *E. coli* for 90 min (Fig. 3a), which is considered as the onset of 5-LO product formation under these conditions [27]. Moreover, the subcellular redistribution of 5-LO



**Fig. 3** Influence of A549 cell coculture on the mobilization of  $[Ca^{2+}]_i$  and LO translocation in MDM. MDM were cocultured with A549 cells or kept in monocultures in a Boyden chamber (see Fig. 1a) for 48 h in the presence of IL-4 and separated from A549 cells. **a** Measurement of  $[Ca^{2+}]_i$  in Fura-2-AM-loaded MDM resuspended in HEPES-BSA buffer containing 1 mM  $Ca^{2+}$  and exposed to *E. coli* (O6:K2:H1; ratio=1:50) or PBS (vehicle) at 37 °C for up to 90 min. The ratio of absorbance at 340 vs. 380 nm reflecting  $[Ca^{2+}]_i$  of MDM stimulated with *E. coli* versus unstimulated cells over 90 min (left panel). Data are given as AUC of MDM stimulated with

*E. coli* subtracted by the AUC of unstimulated MDM (right panel), means  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$  separate donors. Two-tailed  $t$  test. **b** MDM were challenged with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio=1:50) or PBS (vehicle) for 90 min at 37 °C. MDM on cover slips were fixed, permeabilized, stained with antibodies against 5-LO (red), FLAP (green), and 15-LO-1 (cyan-blue), and then analyzed by immunofluorescence microscopy. Scale bars=10  $\mu$ m (upper panel), 20  $\mu$ m (lower panel). Results shown for single cells are representative for approx. 100 individual cells analyzed in  $n=3$  independent experiments

determines the capacity of various leukocytes to produce 5-LO products, with intranuclear 5-LO being favorable in this respect [36]. Immunofluorescence microscopy showed a similar subcellular localization of 5-LO in IL-4-treated MDM independent on whether A549 cells were present, both, in unstimulated and *E. coli*-activated cells (Fig. 3b).

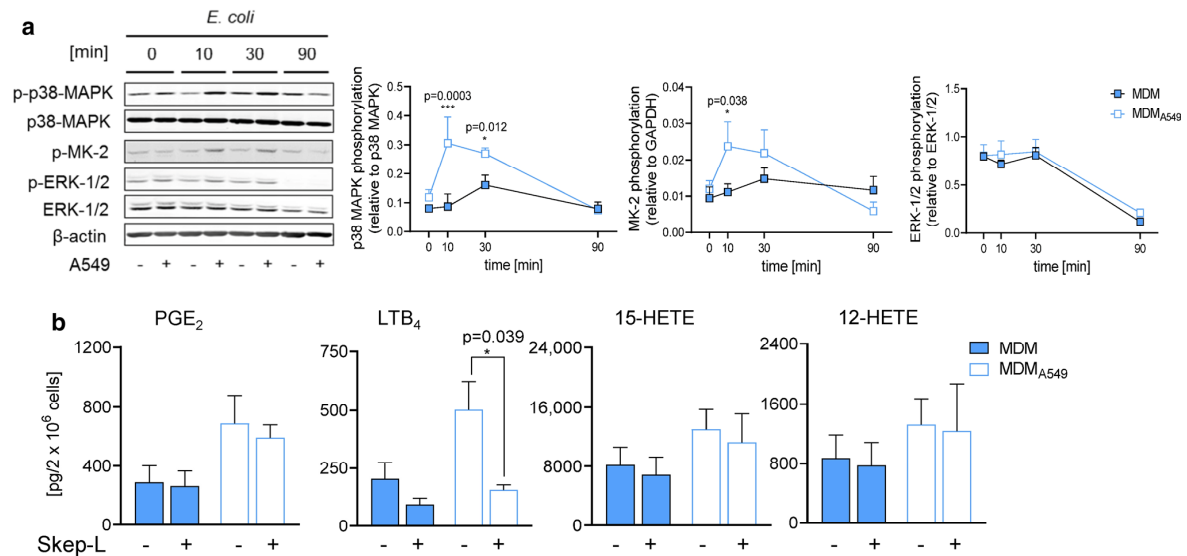
Next, we assessed if preceding coculture of IL-4-treated MDM with A549 cells influences the activation of MK-2 and ERK-1/2 upon MDM activation by *E. coli*. Exposure of MDM to *E. coli* increased the phosphorylation/activation of MK-2 within 10–30 min which was maintained up to 90 min (Fig. 4a). Without preceding A549 cell coculture, MK-2 phosphorylation was elevated after 10 min of exposure to *E. coli* and declined again at 90 min, whereas the upstream p38 MAPK was only transiently activated in MDM after 30 min (Fig. 4a). After coculture of MDM with A549 cells and stimulation with *E. coli*, both MK-2 and p38 MAPK phosphorylation were instead strongly increased at 10–30 min (Fig. 4a). In contrast, ERK-1/2 phosphorylation was not enhanced by *E. coli* in IL-4-activated MDM, and coculture with A549 cells was without further effect (Fig. 4a).

Finally, we used the selective p38 MAPK inhibitor Skepinone-L [37] to investigate if the blockade of the p38 MAPK/MK-2 pathway would indeed reverse the 5-LO-stimulatory impact of A549 cells on IL-4-treated MDM. Formation of 5-LO-derived LM (such as  $LTB_4$ ) in *E. coli*-stimulated MDM from cocultures with A549 was efficiently suppressed by Skepinone-L (down to 30%, Fig. 4b and Online Resource 2). Neither COX products nor purely 15-LO-derived LM were markedly impaired by Skepinone-L, while 5-LO/15-LO-derived products were either diminished ( $LXA_4$ ) or

hardly affected (Fig. 4b and Online Resource 2). Note that Skepinone-L also suppressed 5-LO product formation in *E. coli*-stimulated MDM that were grown in the absence of A549, as expected [38, 39], but the magnitude of inhibition was less pronounced (50% of the 5-LO products remained, Fig. 4b and Online Resource 2). Together, our data suggest that the strong upregulation of 5-LO product formation in MDM due to coculture with A549 cells is caused by priming the p38 MAPK/MK-2 pathway that upon subsequent stimulation by *E. coli* is strongly activated and thus stimulates 5-LO activity.

### Coculture of A549 cells with MDM increases COX-2 expression and prostanoid formation

Increased formation of eicosanoids in cancer was reported by many studies before [16–18]. Here, we assessed whether MDM could alter LM biosynthesis in A549 cells using the same coculture model from above. Exposure of A549 cells to *E. coli* caused marked formation of COX products, but in contrast to IL-4-treated MDM, A549 cells failed to produce appreciable amounts of 5-LO and 15-LO products (Fig. 5a). When A549 cells were cocultured with MDM for 48 h and then exposed to *E. coli*, a marked elevation of COX products (i.e.,  $PGE_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $TxB_2$ ) was evident (Fig. 5a, b). The minute amounts of other LM that could be detected (i.e., 5-HETE, 5-HEPE, 4-HDHA, 18-HEPE) were not significantly increased, except for 15-HETE (Fig. 5a), which might be a COX product [40]. Interestingly, the release of AA as COX substrate was rather decreased in A549 due to MDM coculture. Since *E. coli* might constitute, in contrast to MDM, a suboptimal stimulus for non-immune A549 cells,



**Fig. 4** Coculture of MDM with A549 cells primes for activation of the p38 MAPK/MK-2 pathway that mediates increased 5-LO product synthesis. MDM were cocultured with A549 cells or kept in monocultures in a Boyden chamber (see Fig. 1a) for 48 h in the presence of IL-4. **a** MDM were separated and exposed to *E. coli* (O6:K2:H1; ratio=1:50) for the indicated times. Cell lysates were prepared and immunoblotted for phospho-p38 MAPK, p38 MAPK, phospho-ERK-1/2, ERK-1/2, phospho-MK2, and normalized to β-actin

or GAPDH for densitometric analysis. Data are means ± S.E.M.,  $n=3$  separate donors. **b** MDM were preincubated for 15 min with 0.3 μM Skepinone-L or 0.1% DMSO (vehicle) and exposed to *E. coli* (O6:K2:H1; ratio=1:50) for 90 min at 37 °C. LMs were extracted and analyzed by UPLC-MS-MS. Absolute amounts (pg/2 × 10<sup>6</sup> MDM) of selected LM (PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, 15-HETE and 12-HETE) are shown as bar charts. Data are means,  $n=3$ . \* $P<0.05$ , two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test

we also used the Ca<sup>2+</sup>-ionophore A23187, a well-recognized stimulus for 5-LO/COX product formation, to induce COX product biosynthesis. Again, the formation of various PGs, particularly PGE<sub>2</sub>, was strongly increased when A549 were cocultured with IL-4-activated MDM prior to *E. coli* stimulation (Fig. 5c). To elucidate the reason behind the increased COX product levels, we analyzed the expression of COX-2, an inducible enzyme during inflammation and cancer [17], in A549 cells by Western blot. Coculturing with MDM clearly increased COX-2 protein levels in A549 cells (Fig. 5d). Note that IL-4-activated MDM also increased PG formation in HT-29 cells, although less pronounced as in A549 cells, while HUVEC were not affected in this respect (Fig. 5e and Online Resource 3).

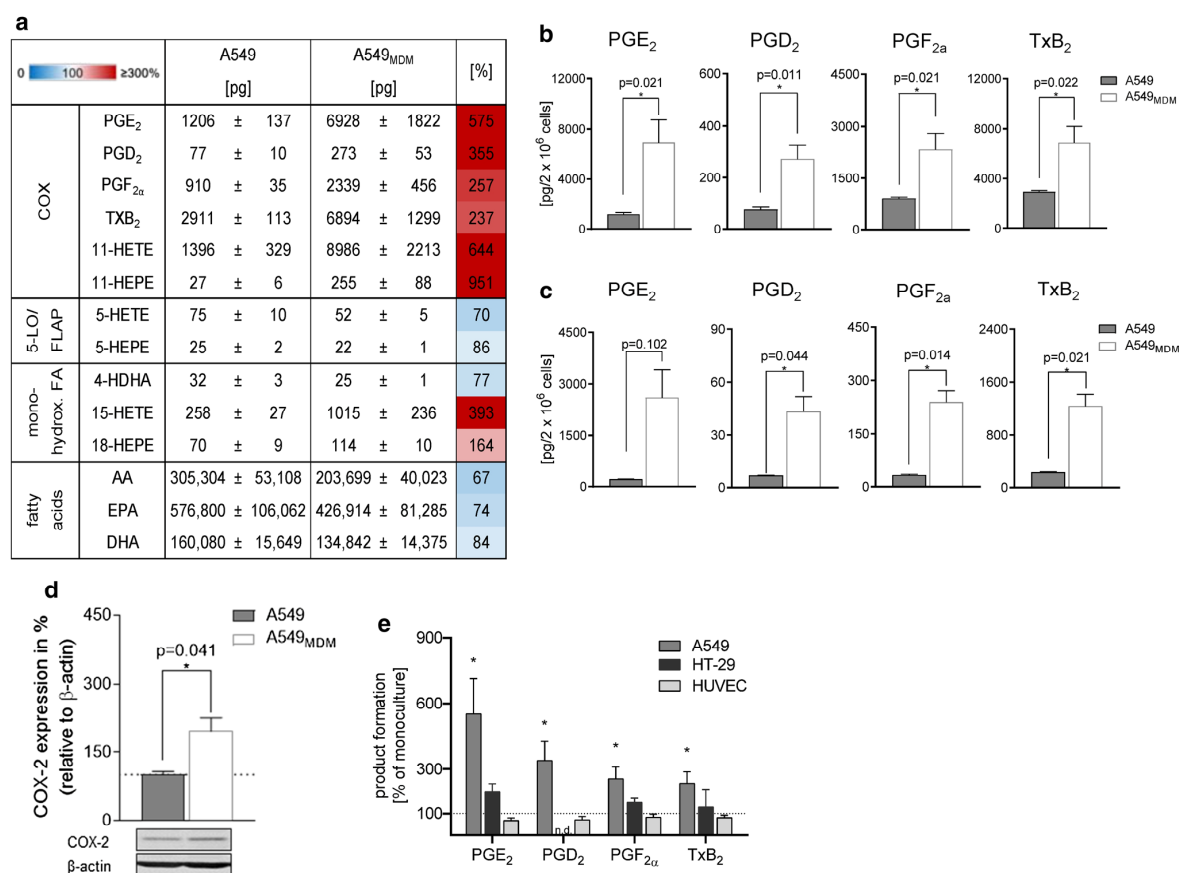
## Discussion

Here we show that the communication between MDM and epithelial cancer cells without direct contacts modifies the capabilities of both cell types to produce LM that are of relevance for tumor biology. Thus, A549 or HT-29 epithelial cancer cells prompt MDM to increase the formation of a broad variety of LM and the release of the fatty acid substrate AA. In particular, various 5-LO-derived LM including

LTB<sub>4</sub>, 5-HETE, LXA<sub>4</sub> and 5,15-diHETE were markedly elevated, likely due to upregulation of the p38 MAPK/MK-2 pathway known to activate 5-LO [38, 39]. Of note, coculture of MDM with non-tumorigenic HUVEC cells or with leukemic HL60 cells failed in this respect, implying cell type-selective communication via signals secreted from epithelial cancer cells. Conversely, MDM prompt epithelial cancer cells (but not HUVEC) for increased COX-2 expression along with elevated PG levels upon subsequent stimulation. Since both LT and PG promote all stages of cancer development [17, 18], our findings reveal a potential mechanism of how cancer cells exploit the communication with TAM to boost the formation of pro-tumoral mediators in the TME for effectively promoting tumorigenesis.

Tumors consist of cancer cells and surrounding stromal cells that intensively communicate, forming the TME, where TAM play crucial roles in supporting all hallmarks of cancer [41]. LM are often formed by transcellular metabolism in a coordinated effort by multiple cell types [25]. Thus, cancer cells, with often overexpressed COX/5-LO pathways [17], may accomplish the generation of elevated and tumor-specific LM profiles in conjunction with eicosanoid-producing TAM in the TME. LM profiling of the TME using an orthotopic model of murine lung cancer revealed increased COX- and 5-LO-derived LM during tumor progression [42].





**Fig. 5** Coculture of A549 cells with MDM increases COX-2 expression and prostanoid formation. A549 cells were cocultured with MDM or kept in monocultures in a Boyden chamber (see Fig. 1a) for 48 h in the presence of IL-4. **a**, **b** A549 cells were separated from MDM and challenged with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio=1:50) for 90 min at 37 °C. Then LM were extracted and analyzed by UPLC-MS-MS. **a** Data for all detectable LM are given as absolute amounts (pg/2 × 10<sup>6</sup> A549 cells, means ± S.E.M., *n*=4) and as percentage of A549 cocultures with MDM versus A549 monocultures (=100%), shown in a heatmap. **b** Absolute amounts (pg/2 × 10<sup>6</sup> MDM) of PG shown as bar charts. Data are means ± S.E.M., *n*=4. \**P*<0.05, two-tailed *t* test. **c** A549 cells were separated from MDM and challenged with 0.5 μM Ca<sup>2+</sup>-ionophore A23187 for 10 min at 37 °C. Then LM were extracted and analyzed by UPLC-MS-MS. Data are given as pg/2 × 10<sup>6</sup> A549 cells, means ± S.E.M., *n*=3. **d** A549 cells were

separated and analyzed for protein expression of COX-2 by Western blot, normalized to β-actin. Western blots are shown as representatives and data are given as means ± S.E.M., *n*=6–10 separate donors; \**P*<0.05, monocultures (100%) versus cocultures, two-tailed *t* test. **e** A549 cells, HT-29 cells or HUVEC were cocultured with MDM or kept in monocultures, each, in the Boyden chamber (see Fig. 1a) for 48 h in the presence of IL-4. A549 cells, HT-29 cells or HUVEC were separated from MDM and challenged with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio=1:50) for 90 min at 37 °C. Then PG were extracted and analyzed by UPLC-MS-MS. Changes in PG formation in A549 cells, HT-29 cells or HUVEC after precedent coculture with MDM, given in percentage versus LM produced in monocultures (=100%), upon subsequent exposure to *E. coli*. Data are means ± S.E.M., *n*=3–4 separate donors; \**P*<0.05, two-tailed *t* test

The primary aim of the present study, however, was not to simply establish LM profiles, which are produced by MDM/cancer cell cocultures and characterize the TME, but rather to investigate how the communication of these cells without contacts would affect the acquired capabilities to generate LM via secreted signals in the respective cell type.

The formation of all COX-, 5-LO- and 12/15-LO-derived LM in MDM were increased upon coculture with A549 cells versus MDM monocultures. However, among the major

LM-biosynthetic enzymes/proteins in MDM, coculture with A549 cells did not alter the protein levels of COX-2, 5-LO, FLAP, and 15-LO-2, and upregulated 15-LO-1 protein expression only by trend, whereas cPLA<sub>2</sub>-α was markedly downregulated. This indicates that except for 15-LO products, alterations in enzyme expression levels play a subordinated role for LM elevation in our coculture model. Also, the moderately increased AA supply is likely not causative, since (1) coculture with HL-60 caused even more robust

AA release without elevation of LM, and (2) also DHA- and EPA-derived LM were increased without concomitant elevation of these fatty acids. Rather stimulatory mechanisms of the respective enzymes are operative, in particular for 5-LO that is highly susceptible to cellular regulatory mechanisms controlling its activity [36].

5-LO and its products including LTB<sub>4</sub>, cys-LTs and 5-HETE affect cancer cell proliferation, angiogenesis, survival and metastasis, and the 5-LO protein was found to be overexpressed in cancers of colon, breast, pancreas, prostate, lung and in glioblastomas [23, 24]. Although cancer cells derived from 5-LO-negative progenitor epithelial cells may acquire 5-LO expression, and thus the capability for LT formation [43, 44], A549 cells in our hands produced no appreciable amounts of 5-LO products. Recent studies showed that the prime source of the substantially elevated LTB<sub>4</sub> levels in lung tumor metastases are 5-LO-positive infiltrating neutrophils [20], monocytic cells [45], or alveolar macrophages [46]. Also, in a murine model of colon polyposis, mast cells were revealed as major source of pro-tumorigenic 5-LO [47], and in ovarian cancer 5-LO expression and levels of 5-LO-derived LM correlated with TAM infiltration [48]. Although 5-LO-derived LM create a pro-inflammatory TME promoting tumorigenesis [23, 24], they can also attract cytotoxic T cells and therefore exhibit anti-tumorigenic potential [49].

Our data provide mechanistic insights into how cancer cells might elevate LT biosynthesis in 5-LO-expressing TAM of the TME. Ringleb et al. showed that MCF-7 breast epithelial cancer cells downregulate 5-LO activity in human TAM-like MDM, which however, required MCF-7 cell death and direct contact with MDM, resulting in the blockade of 5-LO transcription [50]. In our study, 5-LO protein expression in MDM was unaltered after coculture with A549 cells, which were viable and were separated from MDM (devoid of direct contacts). Moreover, crude 5-LO activity in homogenates was unaffected by preceding coculture with A549 cells, suggesting that the amounts of enzymatically active 5-LO in the intact MDM are unaffected. Instead, coculture with A549 facilitated the activation of the p38 MAPK/MK-2 pathway in MDM upon subsequent stimulation. p38 MAPK is the upstream activator of MK-2 that in turn phosphorylates 5-LO at Ser-271 [51], which increases cellular 5-LO product formation [39]. In agreement with previous results [38], pharmacological inhibition of the p38 MAPK/MK-2 using the highly selective p38 MAPK inhibitor Skepinone-L [37] blocked the stimulatory effect of A549 in MDM. Note that Skepinone-L only marginally inhibited the formation of other LM in MDM, such as COX-derived PGs or SPMs, the latter being essentially produced by 15-LO-1 in *E. coli*-stimulated MDM [27]. Activation of ERK-1/2, another 5-LO-activating kinase [52], was not affected in contrast to p38 MAPK/MK-2. Significant upregulation of

other 5-LO-stimulatory events such as increase of  $[Ca^{2+}]_i$  or enhanced 5-LO nuclear translocation [36] were not immediately evident. Conclusively, epithelial cancer cells, but not leukemic HL-60 cells or HUVEC, release or deplete specific factor(s) which are responsible for activation of the p38 MAPK/MK-2 pathway during coculture with MDM, leading to marked 5-LO activity in response to external stimulation.

cPLA<sub>2</sub>-α is a major enzyme in macrophages responsible for the release of AA, which is converted as COX/LO substrate to eicosanoids [53]. Of interest, cPLA<sub>2</sub>α expression was significantly downregulated in MDM when cocultured with A549 cells. Despite the low cPLA<sub>2</sub>α protein levels, these MDM even surpassed MDM monocultures with greater cPLA<sub>2</sub>α amounts in AA supply and AA-derived LM biosynthesis upon *E. coli* exposure. Since p38 MAPK signaling not only induces 5-LO activation but also can increase cPLA<sub>2</sub>α activity and AA release in macrophages [54], we speculated that the higher AA supply in MDM after coculture with A549 cells might depend on the activation of p38 MAPK/MK-2. However, Skepinone-L failed to block the upregulated AA release in contrast to 5-LO product formation, which suggests that alternative pathways of cPLA<sub>2</sub>α activation [53] or possibly other PLA<sub>2</sub> isoforms [55] dominate fatty acid release under these conditions.

Besides PGs and LTs, also SPM must be considered as LM with relevance for tumorigenesis with, however, overall anti-tumoral features [56]. 15-LO-1 is crucial for SPM formation in M2-like MDM [27] and considered to suppress cancer, likely by attenuating inflammation-driven carcinogenesis [57]. 15-LO-1 is commonly downregulated in cancer cells [57] implying reduced capacities for SPM formation. In our hands, 15-LO-1, but not 15-LO-2, was increased by trend in MDM after coculture with A549 cells, and higher levels of 15-LO-derived monohydroxylated AA and DHA products as well as SPM were produced versus MDM from monocultures. Interestingly, 15-HETE secretion from TAMs isolated from renal cell carcinoma was also higher versus normal kidney tissue, albeit in this case the 15-LO-2 pathway was seemingly operative [58].

The LM profile produced by stimulated A549 cells upon coculture with MDM revealed a selective and sustained elevation of the COX-2 pathway with tremendously elevated PGE<sub>2</sub> levels. PGE<sub>2</sub> was also most prominently increased among prostanoids in MDM cocultured with A549 cells. COX-2 is frequently expressed in many types of cancers with a multifaceted role in genesis or promotion of carcinogenesis by supporting apoptotic resistance, proliferation, angiogenesis, inflammation, invasion, and metastasis of cancer cells [59]. Animal studies confirmed the association of genetic COX-2 overexpression with tumorigenesis and malignant progression [60]. Among the COX-derived LM, especially PGE<sub>2</sub> and thromboxanes have been implicated in tumorigenesis and cancer [61]. PGE<sub>2</sub> stimulates tumor epithelial cells

by activating epidermal growth factor receptor (EGFR) and fibroblast growth factor receptor (FGFR)2 signaling, by activating the Ras/ERK-1/2, glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$ -catenin, and PI3K/Akt/peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\delta$  pathways, and by upregulation of Bcl-2, NF- $\kappa$ B, MMP2, and CCR7 [17]. In view of the strikingly increased formation of PG by A549 cells our data warrant further investigations aiming at identifying the molecular signals derived from MDM and elucidating the intracellular mechanisms that cause COX-2 upregulation. Potential candidates might be EGF and VEGF that are known to be released from M2-like TAM and in turn can induce COX-2 transcription [59, 62, 63].

Taken together, we showed here how the communication between human TAM-like MDM and epithelial cancer cells in cocultures dictate the acquirement of cell type-specific patterns of aberrant LM-biosynthetic pathways with potential consequences for tumorigenesis. Targeting bioactive lipids within the tumor and surrounding TME is eventually considered as a novel therapeutic approach for treating cancer patients [56]. Our results support such strategy for intervention with tumors by revealing that the formation of cancer-affecting LM is enhanced through contact-independent interactions between cancer cells and MDMs.

**Acknowledgements** This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB1127 ChemBioSys and SFB1278 Pol-target). J.G. received a Carl Zeiss stipend.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T (2012) The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 125:5591–5596
- Biswas SK, Allavena P, Mantovani A (2013) Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol* 35:585–600
- Goswami KK, Ghosh T, Ghosh S, Sarkar M, Bose A, Baral R (2017) Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. *Cell Immunol* 316:1–10
- Prenen H, Mazzone M (2019) Tumor-associated macrophages: a short compendium. *Cell Mol Life Sci* 76:1447–1458
- Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A (2008) The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 222:155–161
- Biswas SK, Mantovani A (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 11:889–896
- Murakami M (2011) Lipid mediators in life science. *Exp Anim* 60:7–20
- Calder PC (2006) Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:197–202
- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294:1871–1875
- Serhan CN (2014) Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510:92–101
- Serhan CN, Levy BD (2018) Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J Clin Invest* 128:2657–2669
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436–444
- Crusz SM, Balkwill FR (2015) Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nat Rev Clin Oncol* 12:584–596
- Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D (2011) Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandin Other Lipid Mediat* 96:27–36
- Nie D, Honn KV (2002) Cyclooxygenase, lipoxygenase and tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 59:799–807
- Wang D, Dubois RN (2010) Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer* 10:181–193
- Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A (2009) The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 30:377–386
- Kim W, Son B, Lee S, Do H, Youn B (2018) Targeting the enzymes involved in arachidonic acid metabolism to improve radiotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 37:213–225
- Wculek SK, Malanchi I (2015) Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature* 528:413–417
- Sulciner ML, Serhan CN, Gilligan MM, Mudge DK, Chang J, Gartung A, Lechner KA, Bielenberg DR, Schmidt B, Dalli J, Greene ER, Gus-Brautbar Y, Piwowarski J, Mammoto T, Zurakowski D, Perretti M, Sukhatme VP, Kaipainen A, Kieran MW, Huang S, Panigrahy D (2018) Resolvins suppress tumor growth and enhance cancer therapy. *J Exp Med* 215:115–140
- Gilligan MM, Gartung A, Sulciner ML, Norris PC, Sukhatme VP, Bielenberg DR, Huang S, Kieran MW, Serhan CN, Panigrahy D (2019) Aspirin-triggered proresolving mediators stimulate resolution in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 16:6292–6297
- Moore GY, Pidgeon GP (2017) Cross-talk between cancer cells and the tumour microenvironment: the role of the 5-lipoxygenase pathway. *Int J Mol Sci* 18:E236
- Weigert A, Strack E, Snodgrass RG, Brune B (2018) mPGES-1 and ALOX5/15 in tumor-associated macrophages. *Cancer Metastasis Rev* 37:317–334
- Capra V, Rovati GE, Mangano P, Buccellati C, Murphy RC, Sala A (2015) Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators. *Biochim Biophys Acta* 1851:377–382
- Raasch M, Rennert K, Jahn T, Peters S, Henkel T, Huber O, Schulz I, Becker H, Lorkowski S, Funke H, Mosig A (2015) Microfluidically supported biochip design for culture of endothelial cell layers with improved perfusion conditions. *Biofabrication* 7:015013
- Wertz O, Gerstmeier J, Libreros S, De la Rosa X, Werner M, Norris PC, Chiang N, Serhan CN (2018) Human macrophages differentially produce specific resolvins or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. *Nat Commun* 9:59
- Werner M, Jordan PM, Romp E, Czapska A, Rao Z, Kretzer C, Koeberle A, Garscha U, Pace S, Claesson HE, Serhan CN, Wertz O, Gerstmeier J (2019) Targeting biosynthetic networks of the proinflammatory and proresolving lipid metabolome. *FASEB J* 33:6140–6153
- Pace S, Pergola C, Dehm F, Rossi A, Gerstmeier J, Troisi F, Pein H, Schaible AM, Weinigel C, Rummeler S, Northoff H, Laufer S, Maier TJ, Radmark O, Samuelsson B, Koeberle A, Sautebin L,



- Werz O (2017) Androgen-mediated sex bias impairs efficiency of leukotriene biosynthesis inhibitors in males. *J Clin Invest* 127:3167–3176
30. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA (2014) Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41:14–20
  31. Li J, Diao B, Guo S, Huang X, Yang C, Feng Z, Yan W, Ning Q, Zheng L, Chen Y, Wu Y (2017) VSIG4 inhibits proinflammatory macrophage activation by reprogramming mitochondrial pyruvate metabolism. *Nat Commun* 8:1322
  32. Dalli J, Serhan CN (2012) Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage effero-cytosis and pro-resolving mediators. *Blood* 120:e60–72
  33. Araujo P, Belghit I, Aarsaether N, Espe M, Lucena E, Holen E (2019) The effect of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids on the production of cyclooxygenase and lipoxigenase metabolites by human umbilical vein endothelial cells. *Nutrients* 11:E966
  34. Mosca M, Polentarutti N, Mangano G, Apicella C, Doni A, Mancini F, De Bortoli M, Coletta I, Polenzani L, Santoni G, Sironi M, Vecchi A, Mantovani A (2007) Regulation of the microsomal prostaglandin E synthase-1 in polarized mononuclear phagocytes and its constitutive expression in neutrophils. *J Leukoc Biol* 82:320–326
  35. Werz O, Steinhilber D (2005) Development of 5-lipoxygenase inhibitors—lessons from cellular enzyme regulation. *Biochem Pharmacol* 70:327–333
  36. Radmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B (2015) 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1851:331–339
  37. Koeberle SC, Romir J, Fischer S, Koeberle A, Schattel V, Albrecht W, Grutter C, Werz O, Rauh D, Stehle T, Laufer SA (2011) Skepinone-L is a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *Nat Chem Biol* 8:141–143
  38. Werz O, Burkert E, Samuelsson B, Radmark O, Steinhilber D (2002) Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 99:1044–1052
  39. Werz O, Klemm J, Samuelsson B, Radmark O (2000) 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5261–5266
  40. Mazaleuskaya LL, Lawson JA, Li X, Grant G, Mesaros C, Grosser T, Blair IA, Ricciotti E, FitzGerald GA (2016) A broad-spectrum lipidomics screen of antiinflammatory drug combinations in human blood. *JCI Insight* 1:e87031
  41. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P (2017) Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 14:399–416
  42. Poczbott JM, Gijon M, Amin J, Hanson D, Li H, Walker D, Weiser-Evans M, Liu X, Murphy RC, Nemenoff RA (2013) Eicosanoid profiling in an orthotopic model of lung cancer progression by mass spectrometry demonstrates selective production of leukotrienes by inflammatory cells of the microenvironment. *PLoS ONE* 8:e79633
  43. Hong SH, Avis I, Vos MD, Martinez A, Treston AM, Mulshine JL (1999) Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. *Cancer Res* 59:2223–2228
  44. Luo M, Lee S, Brock TG (2003) Leukotriene synthesis by epithelial cells. *Histol Histopathol* 18:587–595
  45. Lukic A, Wahlund CJE, Gomez C, Brodin D, Samuelsson B, Wheelock CE, Gabriellsson S, Radmark O (2019) Exosomes and cells from lung cancer pleural exudates transform LTC4 to LTD4, promoting cell migration and survival via CysLT1. *Cancer Lett* 444:1–8
  46. Nosaka T, Baba T, Tanabe Y, Sasaki S, Nishimura T, Imamura Y, Yurino H, Hashimoto S, Arita M, Nakamoto Y, Mukaida N (2018) Alveolar macrophages drive hepatocellular carcinoma lung metastasis by generating leukotriene B4. *J Immunol* 200:1839–1852
  47. Cheon EC, Khazaie K, Khan MW, Strouch MJ, Krantz SB, Phillips J, Blatner NR, Hix LM, Zhang M, Dennis KL, Salabat MR, Heiferman M, Grippo PJ, Munshi HG, Gounaris E, Bentrem DJ (2011) Mast cell 5-lipoxygenase activity promotes intestinal polyposis in APCDelta468 mice. *Cancer Res* 71:1627–1636
  48. Wen Z, Liu H, Li M, Li B, Gao W, Shao Q, Fan B, Zhao F, Wang Q, Xie Q, Yang Y, Yu J, Qu X (2015) Increased metabolites of 5-lipoxygenase from hypoxic ovarian cancer cells promote tumor-associated macrophage infiltration. *Oncogene* 34:1241–1252
  49. Poczbott JM, Nguyen TT, Hanson D, Li H, Sippel TR, Weiser-Evans MC, Gijon M, Murphy RC, Nemenoff RA (2016) Deletion of 5-lipoxygenase in the tumor microenvironment promotes lung cancer progression and metastasis through regulating T cell recruitment. *J Immunol* 196:891–901
  50. Ringleb J, Strack E, Angioni C, Geisslinger G, Steinhilber D, Weigert A, Brune B (2018) Apoptotic cancer cells suppress 5-lipoxygenase in tumor-associated macrophages. *J Immunol* 200:857–868
  51. Werz O, Szellas D, Steinhilber D, Radmark O (2002) Arachidonic acid promotes phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated protein kinase 2 (MK2). *J Biol Chem* 277:14793–14800
  52. Werz O, Burkert E, Fischer L, Szellas D, Dishart D, Samuelsson B, Radmark O, Steinhilber D (2002) Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *FASEB J* 16:1441–1443
  53. Leslie CC (2015) Cytosolic phospholipase A(2): physiological function and role in disease. *J Lipid Res* 56:1386–1402
  54. Gijon MA, Spencer DM, Siddiqi AR, Bonventre JV, Leslie CC (2000) Cytosolic phospholipase A2 is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that do and do not mobilize calcium. Novel role of mitogen-activated protein kinase pathways in cytosolic phospholipase A2 regulation. *J Biol Chem* 275:20146–20156
  55. Giannattasio G, Lai Y, Granata F, Mounier CM, Nallan L, Oslund R, Leslie CC, Marone G, Lambeau G, Gelb MH, Triggiani M (2009) Expression of phospholipases A2 in primary human lung macrophages: role of cytosolic phospholipase A2-alpha in arachidonic acid release and platelet activating factor synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1791:92–102
  56. Sulciner ML, Gartung A, Gilligan MM, Serhan CN, Panigrahy D (2018) Targeting lipid mediators in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 37:557–572
  57. Tian R, Zuo X, Jaoude J, Mao F, Colby J, Shureiqi I (2017) ALOX15 as a suppressor of inflammation and cancer: lost in the link. *Prostaglandin Other Lipid Mediat* 132:77–83
  58. Daurkin I, Eruslanov E, Stoffs T, Perrin GQ, Algood C, Gilbert SM, Rosser CJ, Su LM, Vieweg J, Kusmartsev S (2011) Tumor-associated macrophages mediate immunosuppression in the renal cancer microenvironment by activating the 15-lipoxygenase-2 pathway. *Cancer Res* 71:6400–6409
  59. Hashemi Goradel N, Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K (2019) Cyclooxygenase-2 in cancer: a review. *J Cell Physiol* 234:5683–5699
  60. Muller-Decker K (2011) Cyclooxygenase-dependent signaling is causally linked to non-melanoma skin carcinogenesis: pharmacological, genetic, and clinical evidence. *Cancer Metastasis Rev* 30:343–361



61. Xia D, Wang D, Kim SH, Katoh H, DuBois RN (2012) Prostaglandin E2 promotes intestinal tumor growth via DNA methylation. *Nat Med* 18:224–226
62. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417:182–187
63. Soki FN, Koh AJ, Jones JD, Kim YW, Dai J, Keller ET, Pienta KJ, Atabai K, Roca H, McCauley LK (2014) Polarization of prostate cancer-associated macrophages is induced by milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8)-mediated efferocytosis. *J Biol Chem* 289:24560–24572

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## 4 DISKUSSION

Aus AA-, EPA- und DHA-abgeleitete Lipidmediatoren (LM) spielen eine wichtige Rolle in akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen [4-7]. Dies gilt auch für Krebserkrankungen, bei denen genomische Mutationen und die Tumor-fördernde-Entzündung (inklusive verschiedener LM) Motoren der Tumorprogression sind [9-13]. Makrophagen sind aufgrund ihrer enormen Plastizität in der Lage ein sehr breites LM-Spektrum zu synthetisieren und stellen im Kontext entzündlicher Erkrankungen ein Hauptquelle dieser Mediatoren dar [15, 16]. Dabei weisen die zahlreichen oxygenierten Metabolite aus AA, EPA und DHA sich überschneidende bis völlig gegensätzliche Aktivitäten auf. Anstatt einzelne Mediatoren zu quantifizieren, bedarf es einem Fingerabdruck aus einer Vielzahl an LM um komplexe biologische Prozesse wie entzündliche Erkrankungen besser verstehen und pharmakologisch effizient modulieren zu können [5, 14].

In diesem Sinne war der Kern dieser Arbeit die Entwicklung und Anwendung eines Makrophagen basierten Testsystems zur Charakterisierung umfassender LM-Profile in Abhängigkeit verschiedener modulierender Faktoren. Dazu gehörte die Suche nach geeigneten Stimuli der LM-Biosynthese (Manuskript I), die Entwicklung und Optimierung einer selektiven und sensitiven UPLC-MS/MS basierten Analytik inklusive effizienter Probenaufbereitung (Manuskript II) und die Anwendung des Testsystems zu Gewinnung neuer Erkenntnisse. Unter den letzten Punkt fallen die Untersuchungen, wie pharmakologische Inhibitoren (Manuskript II) oder Nachbarzellen (Manuskript III) das LM-Profil einer Zielzellpopulation verändern können sowie die Erforschung zugrundeliegender Mechanismen. In den nachfolgenden Kapiteln werden die Ergebnisse dieser Studien zusammengefasst und ausführlich diskutiert.

### 4.1 Charakterisierung der Lipidmediatorbiosynthese durch verschiedene Stimuli in Makrophagen

Stimuli, die ein umfassende LM-Biosynthese (insbesondere auch diverse SPM) in humanen Makrophagen initiieren, waren zu Beginn der Studien unbekannt. Unstimulierte Zellen oder schwache Stimuli (ohne Voraktivierung durch sogenannte Priming-Agentien und ohne zusätzliche Zugabe von PUFA als Enzymsubstrate) resultieren oft in sehr geringen bis nicht mehr nachweisbaren LM-Konzentrationen [85, 86]. Besonders schwer detektierbar sind die SPM, die vorwiegend von der humanen 15-LO-1, beziehungsweise der 12/15-LO als murinem Analogon, produziert werden [18, 102]. Unser Ziel war es eine Kombination aus physiologisch relevanten Zellen und Stimuli zu finden, welche die 5-LO-, 15-LO- und COX-Produktbildung initiieren kann und weiterhin diese LM-Bildung im Kontext der zellulären enzymatischen Ausstattung und subzellulären Lokalisation genauer zu beschreiben. Die Erkenntnisse aus zwei Arbeiten bildeten dabei eine wesentliche Grundlage unserer Untersuchungen. (I) Die

Infektion von Mäusen mit *E. coli* im Rahmen selbstauflösender Entzündungen führte zu erhöhten SPM-Konzentrationen in peritonealen Exsudaten [34]. (II) Werden differenzierte Makrophagen mittels LPS und IFN- $\gamma$  zu proinflammatorischen M1-Makrophagen (M1) oder mit IL-4 zu antiinflammatorischen M2-Makrophagen (M2) polarisiert, ergibt sich ein Prostaglandin- und LTB<sub>4</sub>-dominiertes LM-Profil für M1 und ein SPM-dominiertes Profil für M2 [16]. Letztere Arbeit krankte jedoch an dem methodischen Problem, dass kein physiologischer Stimulus zur LM-Bildung eingesetzt wurde. Die stundenlang polarisierten Zellen wurden durch Methanol „abgestoppt“ und die gebildeten LM analysiert. Aus eigenen Versuchen wissen wir, dass Methanol (vermutlich durch Störung der Membranintegrität und veränderter intrazellulärer Ionenkonzentrationen) vor der erwünschten Proteindenaturierung initial die LM-Synthese noch einmal ankurbeln kann. Die erhaltenen LM-Profile ergeben sich somit wahrscheinlich aus Biosynthese (und Metabolisierung) während der Polarisierung und während des unphysiologischen „Abstoppens“ mit Methanol. Sie repräsentieren vermutlich die Enzymausstattung der Zellen, nicht aber eine Enzymaktivität infolge eines physiologischen Stimulus. Außerdem werden LM typischerweise schnell nach der Biosynthese aus der Zelle in das extrazelluläre Medium sezerniert [86]. Im Fall der Methanolzugabe schließt man auch intrazelluläre LM auf. Durch die Generierung von M1 und M2, kurzzeitige Stimulation mit pathogenen Bakterien und Analyse der LM aus dem Überstand der Zellen konnten wir erstmals Makrophagenphänotyp-spezifische LM-Profile mit 5-LO-, 15-LO- und COX-abgeleiteten Produkten auf physiologischere Art und Weise bestimmen.

Wir konnten zeigen, dass stärker virulente Varianten von *E. coli* und *S. aureus* M1 vor allem zur Bildung proinflammatorischer Mediatoren wie PGE<sub>2</sub> (COX) und LTB<sub>4</sub> (5-LO) stimulieren. M2 produzierten hingegen deutlich mehr 15-LO-abgeleitete antiinflammatorische SPM wie Lipoxine (AA) und Resolvine vom E-Typ (EPA) und D-Typ (DHA). Im Vergleich von M1 und M2 führt ein und derselbe Stimulus zu sehr verschiedenen LM-Profilen. Der Makrophagenphänotyp macht den Unterschied. Durch die unterschiedliche Polarisierung wird in-vitro ein normalerweise früh im Entzündungsgeschehen auftretender antimikrobieller M1-Typ oder ein spät auftretender entzündungsaflösender und wundheilungsfördernder M2-Typ generiert [17-19]. Da der Makrophagenphänotyp so entscheidend war, untersuchten wir die LM-Bildung und die Expression beteiligter Enzyme zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Polarisierung mit LPS/IFN- $\gamma$  (M1) oder IL-4 (M2). Korrelierend mit steigender 15-LO-1 Expression in M2 stieg auch die Biosynthesekapazität für SPM und deren Vorstufen mit länger werdenden Polarisierungszeiten. In M1 hingegen stieg insbesondere die PGE<sub>2</sub>-Synthese. Diese Ergebnisse decken sich gut mit einer breit angelegten Transkriptomanalyse für die Differenzierung und Polarisierung von Makrophagen. Für die M1-Polarisierung mit LPS/IFN $\gamma$  konnte eine Hochregulierung von COX-2, für die M2-Polarisierung mit IL-4 von COX-1 und 15-LO-1 nachgewiesen werden [103]. Die Expression von FLAP (5-Lipoxygenase-aktivierendes

Protein), einem Helferprotein von 5-LO, war in M2 zu allen Zeitpunkten der Polarisierung viel niedriger als in M1. Dieses Protein scheint in der Biosynthese von SPM in unserem Modell, zumindest für Resolvine, eine untergeordnete Rolle zu spielen. Allerdings könnte es die tendenziell höhere Bildung von LTB<sub>4</sub> in M1 bei vergleichbarer 5-LO Expression in M1 und M2 erklären. Die 5-LO dioxygeniert AA zu 5(S)-HpETE (5-Hydroperoxyeicosatetraensäure). 5(S)-HpETE kann durch Glutathionperoxidasen zu 5(S)-HETE reduziert werden oder durch die LTA<sub>4</sub>-Synthaseaktivität der 5-LO zum Epoxid LTA<sub>4</sub> umgewandelt werden. LTA<sub>4</sub> kann durch die LTA<sub>4</sub>-Hydrolase zu LTB<sub>4</sub> hydrolysiert werden [88]. Koexpression von 5-LO/FLAP in HEK (human embryonic kidney) 293-Zellen resultierte gegenüber alleiniger 5-LO-Expression in gesteigerter LTA<sub>4</sub>-Bildungskapazität nach Stimulus-getriggelter Koloalokalisation beider Enzyme an Membrankompartimenten [104]. Vermehrte FLAP-Assoziation und damit gesteigerte LTA<sub>4</sub>-Synthase-Aktivität der 5-LO könnte die gesteigerte LTB<sub>4</sub>-Bildung in M1 erklären. Die 15-LO-2 wurde im Rahmen des Manuskriptes I nicht analysiert. Nachfolgend konnten wir experimentell ermitteln, dass sich die 15-LO-2-Expression nicht signifikant zwischen M1 und M2 unterscheidet (nicht veröffentlichte Daten). Dies deckt sich mit Befunden aktueller Literatur. So ist die 15-LO-2 in Makrophagen konstitutiv exprimiert und kann sowohl durch LPS (M1-Polarisierung), als auch IL-4 (M2-Polarisierung) weiter hochreguliert werden [92]. Die 15-LO-2-Expression spielt somit wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle für die Bildung antiinflammatorischer SPM.

Der Makrophagenphänotyp bestimmte maßgeblich das LM-Profil. Die Enzymaktivierungen (COX, 5-LO, 15-LO) mit vergleichsweise hoher LM-Bildung aus endogenen Substratquellen erfolgte jedoch erst durch die Zugabe stärker virulenter Bakterienstämme (*E. Coli*, *S. aureus*). Eine Aktivierung der 15-LO-1 durch Mikroorganismen in isolierten Zellen war bislang nicht bekannt. Die Stimulierung mit einem pathogenem *E. coli* Stamm (O6:K2:H1) war der Aktivierung mit etablierten Agentien wie LPS/fMLP oder Serum-behandelten Zymosan hinsichtlich der gebildeten Mengen an LM weit überlegen. Auch ein durch UV-Licht attenuierter *E. coli* (O6:K2:H1) und die weniger pathogenen *E. coli*-Stämme (JM109 und BL21) konnten die hohe Freisetzung an AA und DHA sowie die verstärkte Bildung von LM, darunter verschiedene SPM und LTB<sub>4</sub>, nicht hervorrufen. Lediglich die Menge der gebildeten Prostaglandine waren vergleichbar. Hierbei zeichneten sich Parallelen zu einer sehr interessanten Studie einer anderen Arbeitsgruppe ab. Diese verglich 16 verschiedene LM-Stimuli in RAW264.7-Zellen. Die 12 Toll-like-Rezeptor-Agonisten (mit TLR 1-7 und TLR-9 als Zielstrukturen) sowie 2 Agonisten an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die zu einem vorübergehenden Calciumeinstrom führten (PAF und UDP), produzierten alle ein vergleichbares, durch Prostaglandine dominiertes, LM-Profil. Lediglich ATP (2 mM; Agonist an den Purinergen Rezeptoren P2Y und P2X) und Ionomycin (rezeptorunabhängige Aktivität), die einen langanhaltenden Calciumeinstrom initiieren, waren in der Lage die Synthese von 5-LO-

Produkten einzuleiten [86]. Es ist gezeigt worden, dass cPLA<sub>2</sub>, 5-LO und 15-LO-1 calciumabhängig zu membranären (substratreichen) Zellkompartimenten translozieren und dort verstärkte Enzymaktivität aufweisen [87, 88, 94, 105]. In unseren Experimenten war der stärker virulente *E. coli* (O6:K2:H1), nicht aber der BL21-Stamm, in der Lage, einen langanhaltenden Calciumeinstrom in Makrophagen zu initiieren und die zelluläre Translokation von 5-LO und 15-LO-1 zu bewirken. Nach Inkubation der Makrophagen mit *E. coli* (O6:K2:H1) in Anwesenheit von EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) und BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) zur Komplexbildung extrazellulären und intrazellulären Calciums war sowohl die Translokation beider LO aufgehoben als auch deren Produktbildung stark vermindert. Insgesamt war also die PAMP-Erkennung allein (LPS/fMLP; Zymosan; Oberflächenstrukturen wenig pathogener Bakterien) nicht in der Lage starke LO-Aktivitäten zu induzieren. Weitere Virulenzfaktoren, die einen langanhaltenden Calciumeinstrom bewirken, sind wahrscheinlich ursächlich für die Enzymtranslokation und gesteigerte LM-Bildungskapazität von *E. coli* (O6:K2:H1) und dem untersuchten *S. aureus*-Stamm. Virulenzfaktoren dienen dem Bakterium in der Regel dazu, dessen Kolonialisierung, Persistenz, Verbreitung oder Verteidigung gegenüber Immunzellen zu verbessern. Membranschädigende, den Ionenhaushalt störende, Peptide sind Beispiele solcher Virulenzfaktoren. Prominente Klassen aus *S. aureus* sind Hämolsine, Leukozidine und PSMs (phenol-soluble modulins). Für definierte Toxine wurde die Induktion der Bioynthese bestimmter LM bereits nachgewiesen [106, 107]. Auch für verschiedene *E. coli*-Stämme konnten in Abhängigkeit ihrer Hämolsinbildungskapazität eine deutliche Leukotrienbildung in humanen PMNL bereits nachgewiesen werden [108, 109]. Die Identifizierung relevanter Toxine war nicht Gegenstand der Forschungsarbeit zum Manuskript I und lässt Raum für weiterführende Experimente. Der Präsenz von bakteriellen Oberflächenantigenen wie LPS, neben möglichen calciumeinstromfördernden Toxinen, kommt einer Voraktivierung (Primen) der Makrophagen gleich und könnte zu synergistisch gesteigerter LM-Bildung geführt haben. Für mehrere Kombinationen aus Voraktivierungsagens und Hauptstimulus konnte eine (wahrscheinlich durch Phosphorylierung vermittelte) zusätzlich erhöhte Produktbildung durch cPLA<sub>2</sub> und 5-LO bereits gezeigt werden [85, 91, 110].

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass die Stimulation von differenzierten und polarisierten Makrophagen mit stärker virulenten Bakterien calciumabhängig zur Translokation von 5-LO und 15-LO-1 und erheblicher LM-Bioynthese führte. Insbesondere die Stimulation von M2, die infolge der IL-4-Polarisierung verstärkt 15-LO-1 exprimieren, führte zu LM aller Hauptsynthesewege (COX, 5-LO und 15-LO) inklusive hoher SPM-Konzentrationen. Studien, die lediglich differenzierte und nicht polarisierte Makrophagen auf verschiedenste Weise (darunter auch *E. coli*) stimulierten, konnten LM-Profile vergleichbarer Qualität und Quantität nicht aufzeigen [111, 112]. Die Stimulation von proinflammatorischen M1 und

antiinflammatorischen M2 mit stärker virulenten Bakterien stellt eine äußerst nützliche Plattform für weiterführende Untersuchungen der Modulation komplexer LM-Profile dar und bildete die Grundlage nachfolgender Arbeiten (Manuskript II und III).

#### **4.2 Etablierung eines UPLC-MS/MS basierten Testsystems zur umfassenden Lipidmediatoranalytik und Charakterisierung komplexer Lipidmediator-Netzwerke für definierte pharmakologische Inhibitoren**

Der Erforschung neuer Therapieoptionen für akute und chronische Entzündungen hat, auch aufgrund der hohen Prävalenz assoziierter Erkrankungen, höchste Priorität. Die Pathophysiologie von verschiedenen kardiovaskulären Krankheitsbildern, Adipositas, Typ-2 Diabetes, Asthma, neurodegenerativer Krankheiten und Krebs ist häufig durch eine chronisch entzündliche Komponente gekennzeichnet [1-3]. Eine Fehlregulierung pro- und antiinflammatorischer, aus AA-, EPA- oder DHA-abgeleiteter LM ist dabei mit den benannten Erkrankungen verknüpft [4-7]. Die Hemmung von vorwiegend proinflammatorischen Prostaglandinen und Leukotrienen und deren Rezeptoren zur Linderung von Schmerz, Schwellung, Fieber, allergischer und asthmatischer Zustände sind klinisch etabliert. Die vor allem symptomatische und weniger kausale Wirkweise sowie unerwünschte Nebenwirkungen limitieren jedoch den Therapieerfolg dieser Substanzen [5, 20, 21, 95, 113]. Besonders kritisch ist, dass sich einige proinflammatorische und antiinflammatorische LM dieselben Biosyntheseenzyme teilen und entsprechende Inhibitoren somit die Entzündung einerseits abmildern, andererseits aber auch deren Auflösung verhindern könnten [5, 20, 21]. Weiterhin birgt die pharmakologische Interferenz mit einem Biosyntheseenzym die Gefahr, dass das Substrat in einen anderen unerwünschten Biosyntheseweg umgeleitet wird [5, 21, 22, 84]. Um ausreichend gute Rückschlüsse auf den Therapieerfolg von LM-Inhibitoren zu erlauben, bedarf es somit einer Analytik, die ein ganzheitlicheres LM-Netzwerk, inklusive der entzündungsaufLösungsfördernden SPM, abbilden kann [14, 20]. Die nötige Basis dafür stellen die Ergebnisse aus Manuskript I dar. Die Stimulierung von humanen proinflammatorischen M1 (repräsentativ für ein frühes Entzündungsgeschehen) und antiinflammatorischen M2 (stellvertretend für die EntzündungsaufLösung), unter Beteiligung aller Hauptbiosyntheseenzyme (COX, 5-LO, 15-LO), liefern pathophysiologische relevante LM-Netzwerke. Die Untersuchung wie sich diese durch die Verwendung definierter Inhibitoren verändern, war Gegenstand des Manuskriptes II.

### 4.2.1 Entwicklung einer UPLC-MS/MS Methode

Die Ergebnisse aus Manuskript I entstanden aus einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. C.N. Serhan an der Harvard Medical School (Boston, USA). Die dort etablierte HPLC-MS/MS-Methode zur LM-Analyse wurde in unserem Labor wie folgt optimiert. Wir übernahmen die Probengewinnung (Differenzierung und Polarisierung von Makrophagen zu M1 und M2, Stimulierung mit stärker virulenten Bakterien) und adaptierten die Festphasenextraktion zur Probenaufbereitung [16, 99]. Neu entwickelten wir eine Methode zur chromatografischen Auftrennung der LM vor der massenspektrometrischen Quantifizierung auf Basis eines UPLC-Verfahrens. Kleinere Partikelgrößen ( $< 2 \mu\text{m}$ ) der stationären Phase mit sehr hohen Arbeitsdrücken resultieren im Vergleich zu HPLC-Methoden in schmalen Peaks, damit höherer Auflösung und niedrigeren Detektionslimits sowie kürzeren Analysezeiten [14]. Während der Methodenoptimierung testeten wir mindestens 30 verschiedene Gradienten, unterschiedlichste Flussraten (0.09 bis 0.7 ml/min), unterschiedliche Lösungsmittelkombinationen (Methanol/Wasser, Acetonitril/Wasser) und pH-Wert-/Ionisierungs-Modifikatoren (Ameisensäure, Essigsäure in verschiedenen Konzentrationen). Schließlich konnten wir die Laufzeit einer Probe von 24.5 (HPLC in Boston) auf 16 Minuten (UPLC in Jena) verkürzen und kritische Spezies (beispielsweise die Isomere  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGD}_2$ ) zufriedenstellend auftrennen. Der finale Gradient für eine auf  $50^\circ\text{C}$ -temperierte RP (reversed phase)-Säule (Aquity UPLC BEH C18  $1.7 \mu\text{m}$ ;  $2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ ) und eine Flussrate von 0.3 ml/min ist in Abb. 5 dargestellt. Die Verwendung des Massenspektrometers AB Sciex 5500 Q TRAP erlaubte uns publizierte generelle und auch Analyten-spezifische MS-Parameter zu übernehmen [16, 100]. So werden schließlich die Analyten im Elektronenspray-Ionisations-Verfahren (ESI) ionisiert (zusätzlich später fragmentiert) und die entstandenen Ionen über die Masse/Ladung-Verhältnisse ( $m/z$ ) in dem elektrischen Wechselfeld der drei Quadrupole selektiert und quantifiziert.

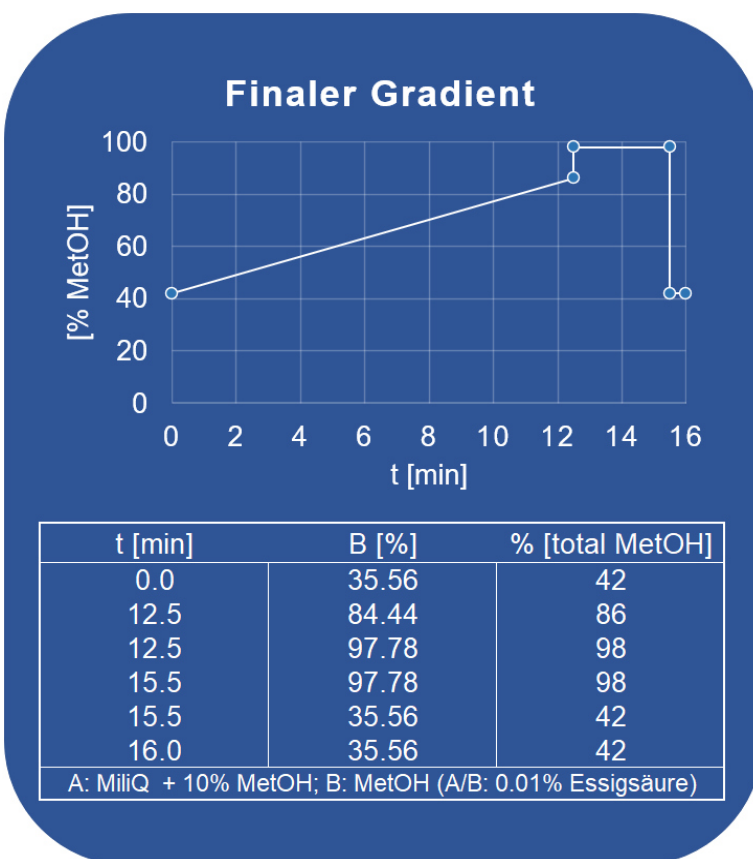


Abb. 5: Finaler UPLC-Fließmittel-Gradient.



Realisiert wurde die Quantifizierung mittels MRM-Methodik (Details siehe Kapitel 1.6.2). Kurzum erlaubt die kombinierte Zuordnung der ionisierten Muttermasse ( $m/z$ ), eines charakteristischen Fragmentierungsproduktes ( $m/z$ ) und einer aus Flüssigkeitschromatografie resultierenden Retentionszeit (min) für jeden Analyten eine hohe Sensitivität und Selektivität für die Quantifizierung [14, 86, 96, 97]. Die Retentionszeiten der Analyten wurden durch kommerziell verfügbare Standards in jeder Messung verifiziert. Variierende Extraktionseffizienz/Wiederfindungsraten wurde(n) durch die Zugabe interner deuterisierter Standards normalisiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels Kalibriergeraden aus externen Standards. Verbesserungspotential liegt in der Auftrennung einiger Isomere. Dieses Problem wurde in der Methodenoptimierung bereits bestmöglich berücksichtigt. Moderne IM-MS (Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie)-Geräte, die neben Flüssigkeitschromatografie bedingten Retentionszeiten und  $m/z$ -Verhältnissen noch eine dritte Selektionskomponente – die Driftzeit eines Moleküls aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften in einem inerten Gas im elektrischen Feld – ausnutzen, versprechen zukünftig noch bessere Isomerentrennung [114]. Selbstverständlich war es mit unserer RP-Säule nicht möglich Enantiomere aufzutrennen. Auch IM-MS kommt hier schnell an seine Grenzen. Chromatografische Verfahren mit chiralen Säulen wären eine Lösung entsprechende Verbindungen (beispielsweise 15(S)-HETE und 15(R)-HETE) voneinander zu trennen. Sehr lange Messzeiten und eine stark limitierte Sensitivität sind der Nachteil solcher Verfahren [14]. Schlussendlich entwickelten wir erfolgreich eine Methode zur Hochdurchsatz-Analytik zahlreicher LM (ohne Enantiomerentrennung) und stellten diese durch nachfolgend beschriebene Inhibitorstudien ausführlich auf die Probe.

#### 4.2.2 COX-Inhibition

COX-Inhibitoren, beziehungsweise NSAR, gehören zu den am häufigsten angewendeten Arzneimitteln und dienen der Linderung akuter Entzündungen und Schmerzen durch Blockade der Prostaglandinbiosynthese [3, 102, 113]. Leider vermag die Wirkstoffklasse Entzündungen allein nicht kausal zu stoppen, steht sogar im Verdacht die Entzündungsauflösung auszubremsen [2, 5]. Zudem ist die Langzeiteinnahme mit gastrointestinalen, renalen und kardiovaskulären Nebenwirkungen durch Blockade homöostatisch wirkender Prostaglandine (vor allem der COX-1) assoziiert. COX-2-selektive Inhibitoren zeigten weniger gastrointestinale Nebenwirkungen, erhöhten allerdings das Risiko für kardiovaskuläre (prothrombotische) Ereignisse über Erhöhung des  $TXA_2/PGI_2$ -Verhältnisses und wurden teilweise vom Markt genommen (Rofecoxib, Valdecoxib) [5, 115]. Wir wollten unser neu etabliertes Testsystem (*E. coli*; M1/M2; UPLC-MS/MS) nutzen, um den unselektiven COX-1/COX-2-Inhibitor Ibuprofen und den selektiven COX-2-Inhibitor Celecoxib auf ihren Einfluss auf ein sehr komplexes LM-Netzwerk erneut auf den Prüfstand zu stellen.

Beide Inhibitoren verringerten erwartungsgemäß sehr effizient die Bildung der Prostaglandine (darunter PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> und TXB<sub>2</sub>). Insbesondere in M1, mit signifikant erhöhter COX-2-Expression, bewirkte dessen

		XX < 50%	X < 90%	↑ > 110%	↑↑ > 150%	LT	PG	LX	D-Rv
Ibuprofen	—					↑	XX	↑	↑
Celecoxib	—					↑↑	XX	↑	—

**Abb. 6: Ergebnisse – COX-Inhibition (vereinfachte Darstellung).**  
Adaptiert von Werner et al. 2019 [Manuskript II].

Blockade aber auch ein erhöhtes Level an freien Fettsäuresubstraten (AA und EPA) sowie wahrscheinlich infolge deren Umleitung (Shunting) eine erhöhte Konzentration an 5-LO-Produkten wie 5-HETE oder LTB<sub>4</sub>. Interessanterweise wurden bereits häufiger erhöhte Leukotrienspiegel in verschiedensten Organen nach NSAR-Einnahme nachgewiesen. Die erhöhten 5-LO-Produkte durch NSAR stehen durch Eigenwirkung oder verstärkte Rekrutierung und Stimulierung entzündungsfördernder Zellen unter Verdacht an verschiedenen Nebenwirkungen (Bronchokonstriktion, Magengeschwüre, kardiovaskuläre Ereignisse, Knorpelschäden) zumindest mitbeteiligt zu sein [23]. Das beschriebene Shunting war stärker für Celecoxib ausgeprägt. Ursache könnte eine schwach inhibitorische Wirkung des hoch konzentrierten Ibuprofens (30 µM) auf die 5-LO (oder FLAP) sein. Starke COX- und leichte 5-LO/FLAP-Hemmung durch Ibuprofen könnte durch Substratumleitung auch die verstärkte Bildung von 12/15-LO Produkten und SPM in M2 erklären. Auch aufgrund eines solchen Shuntings stehen mehr und mehr duale Inhibitoren von COX- und 5-LO-Signalwegen im Fokus aktueller Wirkstoffforschung [22, 23, 113, 116]. Insbesondere eine Hemmung von nachgeschalteten Enzymen einzeln oder in Kombination wie 5-LO/mPGES-1, LTA<sub>4</sub>-Hydrolase/COX, LTA<sub>4</sub>-H/mPGES-1 oder FLAP/mPGES-1 versprechen wünschenswertere LM-Profile (Produkte von COX↓, 5-LO↓, 12/15-LO & SPM↑) [22, 102]. Entsprechende Inhibitoren sollten zukünftig in diesem Testsystem geprüft werden.

#### 4.2.3 5-LO/FLAP-Inhibition

Leukotriene spielen als proinflammatorische Mediatoren eine wichtige Rolle in zahlreichen Erkrankungen mit entzündlicher Komponente (darunter Asthma, Allergien, Atherosklerose und Krebs). Trotz umfangreicher Wirkstoffentwicklungen seit 1982 haben es lediglich ein 5-LO-Inhibitor (Zileuton) und drei Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptorantagonisten (Montelukast, Pranlukast, Zafirlukast) für die Behandlung von Asthma und allergischer Rhinitis zur Marktreife geschafft. Eine mögliche Ursache für diesen nur mäßigen Erfolg ist unter anderem, dass die 5-LO sowohl in die Biosynthese von pro- als auch antiinflammatorischen LM involviert ist [20, 21]. Inhibitoren des 5-LO-Helferproteines FLAP könnten dieses Problem teilweise umgehen. Diese waren direkten 5-LO-Hemmern in in-vivo Experimenten, präklinischen und klinischen Studien häufig überlegen und stehen zunehmend im Fokus aktueller Wirkstoffentwicklungen [20, 117]. Es wird angenommen, dass FLAP als Membrananker und Strukturgeber für die

aktivierte 5-LO fungiert, AA bereitstellt und eine effiziente Konvertierung von 5-HpETE zu LTA<sub>4</sub> fördert [21, 118]. Nach 5-LO Translokation soll sich dabei, früheren Untersuchungen zufolge, erst ein loser 5-LO/FLAP Komplex für eine effiziente Produktbildung ergeben, später soll eine engere Verbindung die Enzymaktivität stoppen [119]. Wir testeten den 5-LO-Inhibitor Zileuton und den FLAP-Inhibitor MK886, um deren Einfluss auf die Modulation komplexer LM-Netzwerke besser vergleichen zu können.

Beide Inhibitoren führten zu einer deutlichen Verringerung der Leukotrienbildung. Erstaunlicherweise zeigten beide Substanzen aber eine stärkere Wirkung in M1 als in M2 (siehe Originalpublikation). Die Ursache dafür

		XX < 50%	X < 90%	↑ > 110%	↑↑ > 150%	LT	PG	LX	D-Rv
Zileuton	—					XX	—	X	X
MK886	—					XX	—	X	↑

**Abb. 7: Ergebnisse – 5-LO/FLAP-Inhibition (vereinfachte Darstellung).** Adaptiert von Werner et al. 2019 [Manuskript II].

ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass die 5-LO-Produktbildung neben der klassischen calciumgetriggerten Aktivierung durch chemische und physikalische Stressoren auch calciumunabhängig (wahrscheinlich durch verstärkte Phosphorylierung der 5-LO) infolge verstärkter Aktivität der p38-Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (p38 MAPK) und nachgeschalteter Kinasen erfolgen kann [90]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der 5-LO-Produktbildung infolge unterschiedlicher Stimuli (mit entweder vorwiegend calciumabhängiger- oder MAPK-bedingter 5-LO-Aktivierung) für ein und denselben Inhibitor verschieden stark erfolgte [120]. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass der Redoxstatus des Testmilieus die Inhibitionskapazität einer Substanz stark beeinflussen kann [121]. Somit könnten unterschiedliche 5-LO-Aktivierungswege oder der Redoxstatus zwischen den Makrophagenphänotypen variieren und den Inhibitionsverlust in M2 erklären. Wir konnten auch zeigen, dass die FLAP-Expression in M2 deutlich geringer ist. Es wäre auch denkbar, dass die häufiger vorkommenden 5-LO/FLAP-Komplexe in M1 eine pharmakologisch besser adressierbare Konformation beider Proteine für die Inhibitoren darstellen könnte. Im Gegensatz zu MK886 hemmte Zileuton auch die 12/15-LO-Produkte, darunter auch verschiedene SPM. Lipoxygenasen (LO) haben ein Eisen im katalytischen Zentrum [95]. Zileuton hat, als N-Hydroxyharnstoffderivat mit sowohl Eisen-chelatisierenden und reduzierenden Eigenschaften und aufgrund der hohen Strukturähnlichkeit verschiedener LO, das Potential unselektiv zu wirken [20, 122-124]. Dies wurde in unseren Versuchen bestätigt. Die Inhibition verschiedener SPM durch Zileuton verwundert aufgrund der Beteiligung mehrerer LO in deren Biosynthese (darunter 5-LO) nicht. Am interessantesten stellte sich das LM-Netzwerk infolge des FLAP-Inhibitors MK886 heraus. Neben reinen 5-LO-Produkten wurde unter den SPM nur das aus AA-abgeleitete 5-LO/15-LO-Produkt LXA<sub>4</sub> gehemmt. Dies konnte in einer weiteren Studie unter anderen experimentellen

Bedingungen ebenfalls gezeigt werden [125]. Erhöht wurden dagegen vor allem, die aus DHA-abgeleiteten SPMs (D-Resolvine, Maresine, Protektine) und deren Vorstufen. Auch auf Basis anderer Forschungsarbeiten schlagen wir folgende Hypothese vor. Die subzelluläre Lokalisation der 5-LO bestimmt deren Substratumsetzung. Perinukleär präsentiert FLAP vorwiegend AA an die 5-LO und fördert die Bildung von Leukotrienen (aber auch LXA<sub>4</sub>). Befindet sich die 5-LO entfernt von FLAP (weil beispielsweise die p38 MAPK-abhängige Phosphorylierung an Serin 271 blockiert ist [126-128] oder ein Inhibitor wie MK886 dessen perinukleäre FLAP-Verankerung inhibiert [119]) könnte die 5-LO verstärkt DHA als Substrat präsentiert bekommen und D-Resolvine statt Leukotriene produzieren. Ein ähnliches LM-Profil konnte auch für den multimodalen mPGES-1/5-LO/FLAP-Inhibitor „Substanz 47“ oder „AF33“ (laborinterner Substanzname) ermittelt werden [116]. Insgesamt scheint es so, als wäre FLAP für die Biosynthese von DHA-abgeleiteten SPM und deren Vorstufen vernachlässigbar. Im Vergleich zu direkten 5-LO-Inhibitoren könnten FLAP-adressierende Wirkstoffe eine erfolgreiche Entzündungsauflösung weniger beeinträchtigen. Das Enzym stellt damit sehr wahrscheinlich die vielversprechendere Zielstruktur in der 5-LO-Kaskade dar.

#### 4.2.4 15-LO-1-Inhibition

Zugelassene Wirkstoffe, welche die 15-LO-1 selektiv hemmen, gibt es bisher nicht. Das liegt auch daran, dass die physiologische Rolle des Enzymes nach wie vor nicht gut genug aufgeklärt ist. In einigen Arbeiten wurde eine proinflammatorische Aktivität des Enzymes nachgewiesen. Beispielsweise sollen Oxygenierungsprodukte der 15-LO-1 (Eoxin A<sub>4</sub>) nach Glutathionkonjugation proinflammatorische, die Gefäßpermeabilität erhöhende, Metabolite bilden und in der Pathogenese verschiedener Atemwegserkrankungen beteiligt sein [129]. Eine andere Arbeit konnte zeigen, dass die 15-LO-1 in dendritischen Zellen die flächige Zellmorphologie und Podosomenbildung bestimmt und die Inhibition der Enzymaktivität die Endozytose- und Migrationskapazität der Zellen signifikant verringerte [130]. Eine Vielzahl an Forschungsarbeiten attestiert der 15-LO-1 jedoch antiinflammatorische Eigenschaften. Beispielsweise zeigte eine Studie, dass die von der 12/15-LO (murines 15-LO-1 Ortholog) biosynthetisierten oxidierten Phosphatidylethanolamin-Spezies, präsentiert auf der Oberfläche gewebtsresidierender Makrophagen, eine sehr maßvolle Phagozytose apoptotischer Zellen im Verlauf einer Entzündung bewirken sollen. Diese oxidierten Phospholipide können spezielle Brückenmoleküle wie milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) abfangen, welche sonst die Efferozytose durch die zahlreichen neu infiltrierten Monozyten katalysieren würden. So soll das Aufräumen apoptotischer Zellen eine exklusive Aufgabe 12/15-LO-positiver gewebtsresidierender Makrophagen bleiben und damit nicht in überschießenden Antigenpräsentationen und Autoimmunreaktionen resultieren [131]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die 12/15-LO erst durch den Efferozytoseprozess (und allgemeine Phagozytose) in Makrophagen hochreguliert wird und diese 12/15-LO-positiven Zellen

einerseits weniger stark durch Toll-like-Rezeptor-Liganden zur Bildung proinflammatorischer Zytokine stimuliert werden konnten, andererseits aber eine erhöhte Abwanderung in lymphoide Organe aufwiesen [19]. Außerdem wurde in verschiedenen Studien beobachtet, dass durch 12/15-LO-generierte oxidierte Phospholipide die Reifung dendritischer Zellen (damit die Antigenpräsentationskapazität) hemmen und 12/15-LO-defiziente Tiere in verschiedenen Modellen entzündlicher Erkrankungen einen schlechteren Verlauf mit verstärkten Autoimmunreaktionen aufzeigen [132]. Zuletzt sind die antiinflammatorischen Aktivitäten anderer Biosyntheseprodukte der 15-LO-1 hervorzuheben, nämlich die der bereits erwähnten SPM. Darunter zählt beispielsweise die Inhibition der PMNL-Migration und die Stimulierung verschiedener nicht-immunogener Phagozytoseprozesse [2, 5-7, 34, 68]. Schlussendlich ist die 15-LO-1 über seine Biosyntheseprodukte einerseits in der Lage Prozesse des Angeborenen Immunsystems zu drosseln, andererseits ist es womöglich (unter anderem durch gesteigerte Migrationskapazität) nennenswert an einer koordinierten, nicht überschießenden Erworbenen Immunantwort beteiligt. Weitere Grundlagenforschung zu dem Enzym ist dringend erforderlich. Dazu gehört auch die Suche und Charakterisierung potenter und selektiver Enzymmodulatoren. Aus diesem Grund wollten wir den vielversprechenden 15-LO-1-Inhibitor 3887 in unserem Testsystem genauer untersuchen.

Wir konnten zeigen, dass 3887 dosisabhängig selektiv die 15-LO-1-Produktbildung, inklusive AA-, EPA- und DHA-abgeleiteter Spezies in M2 hemmt. Auch die duale Reaktionsspezifität der



**Abb. 8: Ergebnisse – 15-LO-1-Inhibition (vereinfachte Darstellung).** Adaptiert von Werner et al. 2019 [Manuskript II].

humanen 15-LO-1 konnte bestätigt werden. Außer an Position C15 oxygeniert das Enzym AA und EPA auch an C12 (Verhältnis: 9:1 und 8.5:1.5), beziehungsweise DHA neben C17 auch C14 (Verhältnis: 6:4) [133]. Somit wurde die Bildung dieser Produkte wie 12-HETE, 12-HEPE (12-Hydroxyeicosapentaensäure), 14-HDHA (14-Hydroxydocosahexaensäure) und abgeleitete SPM auch vermindert. Die 12-LO war in beiden Makrophagenphänotypen vergleichbar gering exprimiert. In M1 (15-LO-1 nicht nachweisbar) wurden 12-LO-Produkte sowie 5-LO- und COX-Produkte nicht gehemmt. Unerwarteterweise resultierte die erfolgreiche 15-LO-1-Hemmung in einer Erhöhung der 5-LO-Produkte in M2. Dies kann an einer Fettsäuresubstratumleitung liegen. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass 15-LO-1-Produkte (15-HETE und 12-HETE) ebenfalls an 5-LO und FLAP binden und die klassische 5-LO-Produktbildung in kompetitiver Art und Weise hemmen können [134, 135]. Die durch 3887 verminderten 15-LO-Produkte könnten auch in diesem Sinne zu erhöhten 5-LO-Produkten geführt haben. 3887 zeigte sich bereits potent und selektiv gegenüber der 15-LO-1 in L1236-Zellen (humane Hodgkin-Lymphom Zellen) und PMNL sowie an verschiedenen isolierten

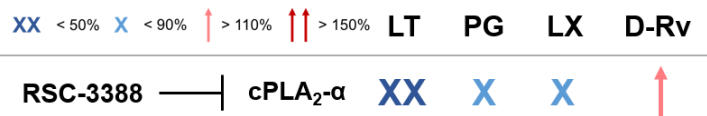
Enzymen [101, 130]. Dies konnte nun erstmals auch an Makrophagen bestätigt werden. Unter Berücksichtigung einer möglicherweise erhöhten 5-LO-Produktbildung eignet sich der Inhibitor gut, um die physiologischen Funktionen der 15-LO-1 zukünftig noch besser zu untersuchen. Ein weiterer antiinflammatorischer therapeutischer Ansatz ist die allosterische Enzymaktivierung der 15-LO-1. Eine vielversprechende Substanz wurde bereits identifiziert und im Vollblut (mit vergleichsweise kleinem LM-Spektrum) erfolgreich getestet [136]. Unser Testsystem eignet sich auch für diese Art von Substanzen, einen pharmakologisch eindeutigeren Fingerabdruck abzubilden.

#### 4.2.5 cPLA<sub>2</sub>-Inhibition

Auch die Regulierung der katalytischen Aktivität verschiedener PLA<sub>2</sub> ist von hohem wissenschaftlichem Interesse. Als übergeordnete Enzyme der LM-Biosynthese sind sie natürlich ebenfalls in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, kardiovaskulärer und neurologischer Störungen sowie Krebs involviert. Leider hat es bisher kein Inhibitor zur Marktreife geschafft. Vielversprechende Substanzen wie Darapladib und Varespladib scheiterten in klinischen Studien [137]. Das Säugetiergenom codiert mehr als 50 verschiedene PLA<sub>2</sub> und verwandte Enzyme [138]. Darunter ist die cPLA<sub>2α</sub> als ein Schlüsselenzym der Eicosanoidbiosynthese unter proinflammatorischen Bedingungen von besonderer Bedeutung [4, 5]. Das gab uns Anlass, den potenten cPLA<sub>2</sub>-Inhibitor RSC-3388 zu testen [139].

Wir konnten zeigen, dass vor allem die Freisetzung von AA und EPA sowie daraus abgeleiteter COX-, 5-LO- und 15-LO-Produkte vermindert werden konnte. Die stärkere Hemmung

in M2 korrelierte mit einer höheren Expression von cPLA<sub>2α</sub> in diesem Phänotyp. Interessanterweise wurde die Freisetzung von DHA und entstandener Metabolite nicht gehemmt, teilweise sogar erhöht. Die Diskriminierung von DHA-haltigen Phospholipiden als Substrat im Vergleich zu Phospholipiden, die mit AA oder EPA verestert waren, konnte für die cPLA<sub>2</sub> in einer früheren Arbeit bereits gezeigt werden [140]. Es ist von hoher Relevanz die PLA<sub>2</sub>(s) zu identifizieren, die für die Freisetzung von DHA (und abgeleiteter SPM) in M1 und M2 ursächlich ist (sind). In dem Fall würde man eine zur Entzündungsauflösung-beitragende PLA<sub>2</sub> in humanen Makrophagen identifizieren. Die sekretorischen Phospholipasen: sPLA<sub>2</sub>-IID, -IIF, -III und -X mit Affinität zu PUFA, darunter AA und DHA, wären vielversprechende Kandidaten [138, 141]. Die Verwendung weiterer selektiver Inhibitoren in unserem Testsystem, inklusive geeigneter Proteinanalytik, könnte zukünftig mehr Klarheit bringen.



**Abb. 9: Ergebnisse – cPLA<sub>2</sub>-Inhibition (vereinfachte Darstellung).** Adaptiert von Werner et al. 2019 [Manuskript II].

#### 4.2.6 Zusammenfassende Erkenntnisse aus den Inhibitorstudien

Im Rahmen des Manuskriptes II etablierten wir erfolgreich ein Entzündungs- (M1) und Entzündungsauflösungs- (M2) angelehntes UPLC-MS/MS basiertes Testsystem zu Erstellung umfassender LM-Netzwerke. Außerdem stellten wir mit Hilfe bereits etablierter Inhibitoren das Testsystem, selbstverständlich auch die Substanzen an sich, umfangreich auf den Prüfstand.

Wir bestätigten in allen Fällen den grundlegenden Wirkmechanismus und erhielten darüber hinaus weitere sehr interessante und teilweise unerwartete Ergebnisse. Dabei hervorzuheben sind: (I) Sowohl COX- als auch 15-LO-1-Inhibitoren erhöhten sehr deutlich die Konzentration der pro-inflammatorischen Leukotriene. (II) FLAP- und 5-LO-Inhibitoren reduzierten die Leukotriene

weniger stark in entzündungsaufLösungsfördernden M2. (III) Zileuton blockte auch die 15-LO-1-Produktbildung, inklusive sämtlicher SPM – während FLAP-Inhibition vor allem DHA-abgeleitete SPM erhöhte. (IV) Der 15-LO-1-Inhibitor 3887 hemmte die Bildung sämtlicher SPM. Weiterhin müssen noch zwei interessante Ergebnisse aus der Korrelationsanalyse (auf Basis sämtlicher Inhibitorbehandlungen) diskutiert werden. Mit Hilfe von Bravais-Pearson-Korrelationen und einer Netzwerkerstellungssoftware (Cytoscape) berechneten wir jeweils ein LM-Netzwerk für M1 und M2. Darin stehen zusammenregulierte Spezies nah beieinander. (I) 15-HETE befindet sich in M2 (15-LO-1↑) erwartungsgemäß in einem „Cluster“ mit anderen 15-LO-1-Spezies. In M1 (COX-2↑) steht 15-HETE dagegen in unmittelbare Nähe zu Prostaglandinen. Dies repräsentiert die potenzielle und bereits mehrfach beschriebene Biosynthese durch COX-Enzyme als eine Art Nebenprodukt [72, 86, 102]. (II) 7-HDHA, eine Vorstufe des am häufigsten in M2 beobachteten SPM RvD5 [7(S),17(S)-dihydroxyDHA], steht in M1 gemäß der postulierten Biosynthese in unmittelbarer Nähe zu anderen 5-LO-Produkten [6, 100]. In M2 befindet sich 7-HDHA allerdings im 15-LO-1-Cluster. Daraus schließen wir, dass RvD5 in M2 womöglich auch nur durch die 15-LO-1 gebildet werden kann. Doppelte Oxygenierung an zwei verschiedenen Positionen des Fettsäuresubstrates durch ein und dieselbe LO wurde beispielsweise für LXB<sub>4</sub> bereits beschrieben [142]. Die Biosynthese von RvD5 in M2 gilt es in weiterführenden Studien genauer zu untersuchen. Schlussendlich liefert unser Testsystem sehr umfassende LM-Netzwerke. Für pharmakologische Interventionen wird

		XX < 50%	X < 90%	↑ > 110%	↑↑ > 150%	LT	PG	LX	D-Rv
Ibuprofen	—					↑	XX	↑	↑
Celecoxib	—				↑↑	↑↑	XX	↑	—
Zileuton	—					XX	—	X	X
MK886	—					XX	—	X	↑
3887	—				↑↑	↑↑	—	XX	XX
RSC-3388	—					XX	X	X	↑
						cPLA <sub>2</sub> -α			

**Abb. 10: Ergebnisse der Inhibitorstudien (vereinfachte Darstellung).** Adaptiert von Werner et al. 2019 [Manuskript II].



sowohl der Einfluss auf die vorwiegend proinflammatorischen Mediatoren (Prostaglandine und Leukotriene) als auch auf die schwerer detektierbaren antiinflammatorischen Metabolite (SPM) geprüft. Dies macht das Testsystem aus Manuskript II zu einem nützlichen Werkzeug, um zukünftig nebenwirkungsärmere und gezielter entzündungsauflösende Wirkstoffe zu identifizieren und zu entwickeln.

### **4.3 Die Kommunikation zwischen humanen Makrophagen und epithelialen Krebszellen schärft ein protumorales Lipidmediatorprofil**

Die konventionelle Krebstherapie adressiert üblicherweise verschiedene Angriffspunkte im Zellzyklus der Krebszelle. Der wissenschaftliche Fokus hinsichtlich neuer therapeutischer Strategien rückt nun zunehmend auch in Richtung Tumormikroumgebung. Immun- und Stromazellen unterliegen weit weniger stark Therapieresistenz-fördernden Mutationen [75]. Dabei gehören Tumor-assoziierte-Makrophagen (TAM) zu den mit am häufigsten vorkommenden Immunzellen der Tumormikroumgebung [45, 47]. Im Laufe der Krebserkrankung ändern Makrophagen ihren Phänotyp häufig in Richtung eines protumoralen M2-ähnlichen Typs, der wiederum mit schlechter Prognose für den Krebspatienten assoziiert ist [15, 52]. TAM fördern nahezu alle Wesensmerkmale von Krebserkrankungen. Über die Sekretion verschiedenster bioaktiver Mediatoren tragen sie beispielsweise zu verstärkter Proliferation, Angiogenese, Metastasierung, dem Entkommen der Immunüberwachung entarteter Zellen und zu einer Tumor-fördernden-Entzündung maßgeblich bei [9, 15, 43, 45-47, 49]. Zu den verantwortlichen Mediatoren zählen unter anderem LM. Vereinfacht kann man dabei eher protumorale Prostaglandine und Leukotriene sowie vorwiegend antitumorale SPM unterscheiden [8, 10-13]. Im Rahmen des Manuskriptes III entwickelten wir ein Kokulturmodell aus Tumor-assoziierten-/M2-ähnlichen-Makrophagen (TAM/M2) und Krebszellen und studierten den zellkontaktlosen Einfluss auf die LM-Biosynthesekapazität der einzelnen Partner sowie zugrundeliegende Mechanismen. In einem "trans-well Boyden Kammer-System" kokultierten wir in Gegenwart von IL-4 (für ein TAM/M2 generierendes Milieu) die Makrophagen mit verschiedenen humanen Krebszellen (A549: epitheliale Lungenkrebszellen; HT-29: epitheliale Darmkrebszellen; HL-60: promyeloische Blutkrebszellen) für 48 Stunden. Als Kontrollen dienten Makrophagen und Krebszellen in Einzelkultur sowie eine Kokultur von Makrophagen mit der nicht-entarteten Zelllinie HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). Die Kokulturpartner wurden durch eine semipermeable Membran mit 0.4 µm Porendurchmesser getrennt. Dies erlaubt den Austausch sämtlicher löslicher Mediatoren, jedoch keinen Zelldurchtritt.

Im Vergleich zur Einzelkultur konnten wir zeigen, dass die Makrophagen/A549-Kokultur keinen signifikanten Einfluss auf die Makrophagenpolarisierung hinsichtlich charakteristischer

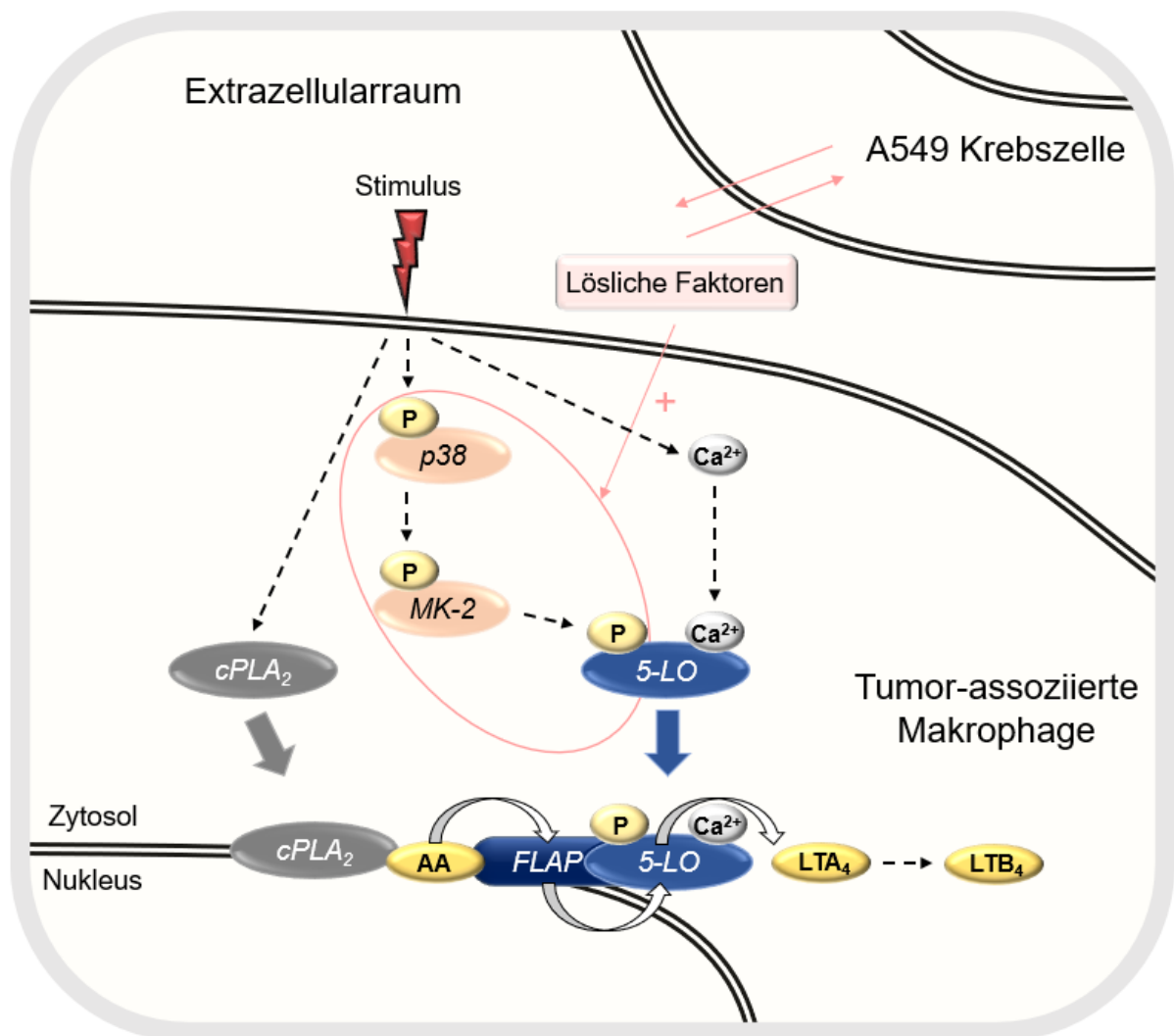
Oberflächenmarker hatte. In Einzel- und Kokultur entwickelten sich M2-ähnliche Makrophagen mit vergleichbar hoher Expression von M2-typischen CD163 und CD206 und niedriger Expression von M1-typischen CD80 [48, 49]. Um den Einfluss auf die LM-Biosynthesekapazität zu untersuchen, separierten wir die einzelnen Zellpartner voneinander, wuschen die Zellen und stimulierten sie mit verschiedenen, die LM-Biosynthese initiiierenden, Agentien (90 min pathogener *E. coli* oder 10 min Calcium-Ionophor). In Analogie zu Manuskript I und II schlossen wir die gebildeten Mediatoren durch Festphasenextraktion auf und quantifizierten diese mittels UPLC-MS/MS.

Wir konnten zeigen, dass die epithelialen Krebszellen A549 und HT-29 in der Lage waren die Biosynthesekapazität eines breiten Spektrums an LM [Leukotriene (5-LO) ↑↑; Prostaglandine (COX) ↑; und 15-LO-1-Produkte↑ - letzteres nur durch A549] in den Makrophagen zu erhöhen. Für die Kokultur mit den promyeloischen HL-60 und den nicht entarteten HUVEC-Zellen konnte dies nicht beobachtet werden. Andererseits waren die Makrophagen in der Lage die Biosynthesekapazität an Prostaglandinen (andere bioaktive LM nicht bis kaum nachweisbar) nur in den epithelialen Krebszellen A549 und HT-29 zu erhöhen. Summa summarum schärfte die zellkontaktlose Kommunikation der Kokultur von TAM/M2 und epithelialen Krebszellen ein protumorales LM-Profil in beiden Interaktionspartnern. Dies ist deshalb interessant, da sowohl Leukotriene als auch Prostaglandine vielfältige tumorfördernde Eigenschaften besitzen [8, 10-13]. Bemerkenswerterweise überschneiden sich diese Ergebnisse stark mit den Resultaten einer Tierversuchsstudie, bei denen syngene murine Lungenkrebszellen (LLC, Lewis lung carcinoma) in die Lungen der Versuchstiere injiziert wurden. Im Laufe der Tumorprogression kam es zu einem starken Anstieg der Leukotrien- und Prostaglandinspiegel. Während die Prostaglandine von Krebszellen und Immunzellen biosynthetisiert wurden, entstanden die Leukotriene wohl ausschließlich durch Neutrophile und Makrophagen der Tumormikroumgebung [143]. Unser Ziel war es jedoch nicht, nur deskriptiv LM-Profile zu erstellen. Dazu ist ein physiologischer Tierversuch besser geeignet. Wir wollten auch zugrundliegende Mechanismen nachvollziehen. Das gelingt in einem 2-Partner-Modell mitunter leichter und nachvollziehbarer als in komplexen Organsimen. Fortan untersuchten wir die mechanistischen Hintergründe für die verstärkte Bildung von Leukotrienen in Makrophagen und Prostaglandinen in Krebszellen im Makrophagen/A549-Kokultur-Modell genauer.

Mit fast dreifach erhöhter LTB<sub>4</sub>-Bildung gegenüber der Kontrolle (A549-kokultivierte Makrophagen versus einzeln kultivierte Makrophagen) zeigt sich der Anstieg der 5-LO-Biosynthesekapazität sehr deutlich. Gemäß Literatur konnte eine verstärkte Expression von 5-LO in vielen Krebsarten nachgewiesen werden [10, 75]. Durch Western Blot Analytik konnten aber lediglich leicht erhöhte 15-LO-1-Expressionslevel in ehemals A549-kokultivierten Makrophagen ermittelt werden. Dies könnte nur die moderat erhöhten 15-LO-Produkte wie 15-HETE oder 17-DHA erklären. Für die 5-LO, sein Helferprotein FLAP sowie die cPLA<sub>2</sub> konnte

jedoch keine Erhöhung hinsichtlich der Enzymexpressionslevel festgestellt werden. Die Ursache für die stark erhöhte 5-LO-Produktbildung musste demnach einer gesteigerten Enzymaktivität geschuldet sein. Das 5-LO-Enzym unterliegt vielfältigen und komplexen Regulationsmechanismen. Beispielsweise wird die Aktivität durch intrazelluläre Calciumlevel, subzelluläre Lokalisation, Interaktion mit Helferproteinen und Phosphorylierungen durch MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAPK-2) oder ERK-1/2 bestimmt [88]. Weiterhin stimulierten wir, via Ultraschallbehandlung erzeugte, Makrophagen-Homogenate aus vorheriger Ko- oder Einzelkultur. Bei Homogenaten geht die Zellintegrität, inklusive physiologischer Enzymregulationsmechanismen verloren und für die LM-Biosynthese bleiben vorwiegend nur die Enzymexpressionslevel entscheidend. Das Ausbleiben der gesteigerten 5-LO-Produktbildung unter diesen Bedingungen unterstrich, dass ein regulatorischer Mechanismus innerhalb intakter Zellen zugrunde liegen musste. Mittels Calcium-Imaging konnten wir ausschließen, dass es während der 90-minütigen bakteriellen Stimulation zu signifikanten Unterschieden der intrazellulären Calciumkonzentration kam. Erst eine Western Blot basierte Analytik von relevanten Proteinkinasen, die an der 5-LO-Phosphorylierung beteiligt sein sollen, brachte Klarheit. Die ehemalige Kokultur mit epithelialen Lungenkrebszellen A549 führte zu einer Art Voraktivierung der Makrophagen, sodass während der Stimulation das Phosphorylierungsausmaß der p38 MAPK und nachgeschalteter MAPKAPK-2 erhöht wurde. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine p38 MAPK - MAPKAPK-2 - Kaskade die 5-LO an Serin 271 phosphoryliert wird und diese Phosphorylierung mit gesteigerter zellulärer 5-LO-Produktbildung einhergeht [24, 25]. Die Relevanz des potenziellen p38 MAPK - MAPKAPK-2 - Signalwegs zur Erhöhung der 5-LO-Produktbildung in vorher A549-kokultivierten Makrophagen wurde durch Einsatz des selektiven p38 MAPK-Inhibitors Skepinone-L unterstrichen [144]. Die durch vorherige Kokultur erhöhte 5-LO-Produktbildung wurde durch Skepinone-L selektiv und effizient gehemmt. Die p38 MAPK wird durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert. Neben Zytokinen und Hormonen wird die Kinase durch verschiedenste Formen von Zellstress stimuliert [145]. Man könnte mutmaßen, die epithelialen Krebszellen stellten für die Makrophagen bereits einen starken Stressor dar und machten die Immunzellen für einen weiteren Stressor, in unserem Fall die bakterielle Stimulation, noch empfindlicher. Auch in weiteren großangelegten Tierversuchsstudien stellte sich die Kommunikation von Krebs- und Immunzellen mit erhöhter 5-LO Produktbildung als kritisch heraus. So selektierten die von Neutrophilen Granulozyten- oder Makrophagen-abgeleiteten 5-LO-Produkte, über gezielt proliferationsfördernde Eigenschaften, besonders Metastase-aktive Krebszellphänotypen heraus und resultierten in vermehrten und größeren metastasierten Geschwüren [146, 147]. Darüber hinaus können 5-LO-Produkte an der Rekrutierung weiterer metabolisch aktiver TAM beteiligt sein [148]. 5-LO-Inhibitoren zum Allheilmittel metastasierender Krebserkrankungen zu erklären wäre jedoch voreilig. Immerhin

sind die Metabolite beispielsweise auch in der Anlockung antitumoral wirkender zytotoxischer T-Zellen involviert [76, 77]. Da mitunter der G-Protein-gekoppelte LTB<sub>4</sub>-Rezeptor BLT2 für die proliferationsfördernden und Metastase-initiierenden Eigenschaften in Verdacht steht [146, 147], aber BLT1 verstärkt Chemotaxis vermittelt [6], wäre ein selektiver BLT2-Inhibitor vielleicht eine bessere Option, als ein Inhibitor der 5-LO-Biosynthese. Weiterführende Studien diesbezüglich sind sicherlich sinnvoll. Unsere Arbeit zeigt einen möglichen Mechanismus auf, wie Krebszellen TAM ausnutzen können, potenziell protumorale Leukotriene in der Tumormikroumgebung anzureichern.



**Abb. 11:** Die zellkontaktlose Kommunikation zwischen Makrophagen und epithelialen Krebszellen erhöht die Leukotrienbildungskapazität der Immunzellen durch eine Verstärkung der p38 MAPK - MAPKAPK-2 (MK-2) – Aktivierungsachse der 5-LO

Wie bereits erwähnt, erhöhten auch die TAM/M2 die Prostaglandinsynthese in A549 und etwas weniger stark auch in HT-29. Beispielsweise resultierte die vorherige Kokultivierung der A549-Zellen in einer Erhöhung der PGE<sub>2</sub>-Synthese auf fast das Sechsfache des Kontrollniveaus. Die Prostaglandinbiosynthese der entarteten Epithelzellen durch bakterielle Stimulation ist

nicht unbedingt verwunderlich. Epithelzellen bilden die äußerste Schnittstelle eines Organismus zu seiner Umwelt. Im Sinne eines Frühwarnsystems können sie vermutlich erste immunologische Prozesse einleiten. Es wurde beispielsweise nachgewiesen, dass unterschiedlichste bakterielle Poren-formende Toxine (PFT), vermutlich durch Störung der Kaliumhomöostase, die Phosphorylierung der p38 MAPK bewirken [149, 150]. Infolge dessen wurde beispielsweise auch in A549 verstärkt IL-8, ein potenter Lockstoff für Neutrophile Granulozyten, ausgeschüttet [149]. Des Weiteren können bakterielle PFT über einen verstärkten Calciumeinstrom die Aktivität der cPLA<sub>2</sub> erhöhen und damit Substrate für die LM-Synthese bereitstellen [106]. Tatsächlich führte auch eine Stimulation mit Calcium-Ionophor, was zu einem starken Calciumeinstrom führt [90], zu einer ausgeprägten Prostaglandinbildung in A549. Diese wurde ebenfalls durch vorherige Kokultivierung mit den Makrophagen erheblich verstärkt. Um hinter die Ursache der verstärkten Prostaglandinbildung zu kommen, untersuchen wir die Expression von COX-2, einem Enzym, welches im Kontext einer Entzündung und während der Tumورprogression oftmals stark induziert wird [10]. In der Tat führte die zellkontaktlose Kommunikation mit TAM/M2 während der Kokultivierung zu einer verstärkten Expression der COX-2 in A549. Ähnlich der verstärkten 5-LO Produktbildung in Makrophagen, ist die erhöhte Prostaglandinbildung durch Hochregulierung der COX-2 in Krebszellen als kritisch einzuschätzen. Die COX-2 korreliert mit schlechter Prognose für den Krebspatienten. Zum einen dämpft es über verschiedene Wege die antitumorale Immunantwort [8, 11]. Zum anderen induziert es stammzellartige Aktivität der Krebszellen, vermittelt Apoptoseresistenz, Proliferation, Angiogenese, Entzündung sowie Invasion und Metastasierung [151].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die zellkontaktlose Kommunikation von epithelialen Krebszellen und TAM/M2-like Makrophagen über erhöhte Biosynthesekapazität von Leukotrienen (durch Verstärkung eines p38 MAPK - MAPKAPK-2 - Signalwegs in Makrophagen) und Prostaglandinen (durch verstärkte COX-2 Expression in den Krebszellen) zu einer krebsfördernden Tumormikroumgebung beitragen kann. Nachfolgende Arbeiten könnten aufklären, inwiefern die Krebszellkokultur den p38 MAPK - MAPKAPK-2 - Signalweg in Makrophagen für eine erneute Stimulation voraktiviert und welche Faktoren durch Makrophagen an- oder abgereichert werden, sodass die COX-2 in den epithelialen Lungenkrebszellen A549 hochreguliert wird.

#### 4.4 Schlusswort

Zusammenfassend ist es mit dieser Arbeit gelungen, stärker virulente Bakterien als hervorragende physiologische Stimuli für alle Hauptbiosyntheseenzyme der LM-Bildung, nämlich COX, 5-LO, und 15-LO, zu identifizieren (Manuskript I). Vielmehr noch konnten wir am Beispiel der 5-LO zeigen, dass dabei sowohl calcium- als auch phosphorylierungsabhängige Enzymregulierungen involviert sind (Manuskript I und III). Die Kombination eines solchen Stimulus mit diversen Makrophagenphänotypen sowie die Etablierung einer selektiven und sensitiven UPLC-MS/MS basierten Analytik führte zu einem Testsystem mit sehr umfassenden und aussagekräftigen LM-Profilen. Diese Werkzeuge erlaubten uns die gesamtheitliche Modulation der LM durch definierte pharmakologische Substanzen (Manuskript II) oder die zellkontaktlose Kommunikation mit anderen Zellen (Manuskript III) bestmöglich nachzuvollziehen und mündeten in neuen, teils unerwarteten, Ergebnissen. Damit trägt die vorliegende Arbeit zur Identifizierung von potenziell nebenwirkungsärmeren und effizienteren entzündungsauflösenden Wirkstoffen bei. Auf lange Sicht könnten dabei besonders vielversprechende Substanzen einen therapeutischen Benefit in einer Vielzahl akuter- und/oder chronisch-entzündlicher Erkrankungen, darunter auch Krebs, leisten. Außerdem stellt das etablierte Testsystem in Kombination mit weiterführender experimenteller Methodik (wie in Manuskript III exemplarisch gezeigt) eine große Hilfe zur Aufklärung zugrundeliegender Mechanismen für eine veränderte LM-Biosynthese in verschiedensten experimentellen Settings dar.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
2. Serhan, C.N., *Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology*. Nature, 2014. **510**(7503): p. 92-101.
3. Tabas, I. and C.K. Glass, *Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities*. Science, 2013. **339**(6116): p. 166-172.
4. Shimizu, T., *Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2009. **49**: p. 123-50.
5. Dennis, E.A. and P.C. Norris, *Eicosanoid storm in infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(8): p. 511-23.
6. Stables, M.J. and D.W. Gilroy, *Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution*. Prog Lipid Res, 2011. **50**(1): p. 35-51.
7. Basil, M.C. and B.D. Levy, *Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(1): p. 51-67.
8. Kalinski, P., *Regulation of immune responses by prostaglandin E2*. J Immunol, 2012. **188**(1): p. 21-8.
9. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
10. Wang, D. and R.N. Dubois, *Eicosanoids and cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(3): p. 181-93.
11. Prima, V., et al., *COX2/mPGES1/PGE2 pathway regulates PD-L1 expression in tumor-associated macrophages and myeloid-derived suppressor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(5): p. 1117-1122.
12. Weigert, A., et al., *mPGES-1 and ALOX5-15 in tumor-associated macrophages*. Cancer Metastasis Rev, 2018. **37**(2-3): p. 317-334.
13. Sulciner, M.L., et al., *Targeting lipid mediators in cancer biology*. Cancer Metastasis Rev, 2018. **37**(2-3): p. 557-572.
14. Astarita, G., et al., *Targeted lipidomic strategies for oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(4): p. 456-68.
15. Prenen, H. and M. Mazzone, *Tumor-associated macrophages: a short compendium*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2019. **76**(8): p. 1447-1458.
16. Dalli, J. and C.N. Serhan, *Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators*. Blood, 2012. **120**(15): p. e60-72.
17. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 723-37.
18. Dioszeghy, V., et al., *12/15-Lipoxygenase regulates the inflammatory response to bacterial products in vivo*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 6514-24.
19. Schiff-Zuck, S., et al., *Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids*. Eur J Immunol, 2011. **41**(2): p. 366-79.
20. Werz, O., J. Gerstmeier, and U. Garscha, *Novel leukotriene biosynthesis inhibitors (2012-2016) as anti-inflammatory agents*. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2017. **27**(5): p. 607-620.
21. Haeggstrom, J.Z., *Leukotriene biosynthetic enzymes as therapeutic targets*. J Clin Invest, 2018. **128**(7): p. 2680-2690.
22. He, C., et al., *Dynamic eicosanoid responses upon different inhibitor and combination treatments on the arachidonic acid metabolic network*. Mol Biosyst, 2012. **8**(5): p. 1585-94.
23. Burnett, B.P. and R.M. Levy, *5-Lipoxygenase metabolic contributions to NSAID-induced organ toxicity*. Adv Ther, 2012. **29**(2): p. 79-98.
24. Werz, O., et al., *5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5261-6.



25. Werz, O., et al., *Arachidonic acid promotes phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated protein kinase 2 (MK2)*. J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 14793-800.
26. Netea, M.G., et al., *A guiding map for inflammation*. Nat Immunol, 2017. **18**(8): p. 826-831.
27. Medzhitov, R., *Inflammation 2010: new adventures of an old flame*. Cell, 2010. **140**(6): p. 771-6.
28. Dempsey, P.W., S.A. Vaidya, and G. Cheng, *The Art of War: Innate and adaptive immune responses*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2003. **60**(12): p. 2604-2621.
29. Stephen, B. and J. Hajjar, *Overview of Basic Immunology and Translational Relevance for Clinical Investigators*. Adv Exp Med Biol, 2018. **995**: p. 1-41.
30. Schildberg, F.A., et al., *Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 955-72.
31. Fullerton, J.N. and D.W. Gilroy, *Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier*. Nat Rev Drug Discov, 2016. **15**(8): p. 551-67.
32. Ortega-Gomez, A., M. Perretti, and O. Soehnlein, *Resolution of inflammation: an integrated view*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(5): p. 661-74.
33. Newson, J., et al., *Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity*. Blood, 2014. **124**(11): p. 1748-1764.
34. Chiang, N., et al., *Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements*. Nature, 2012. **484**(7395): p. 524-8.
35. Parente, L. and E. Solito, *Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein*. Inflamm Res, 2004. **53**(4): p. 125-32.
36. Sima, P., L. Vannucci, and V. Vetvicka, *Immunity in cancer and atherosclerosis*. Ann Transl Med, 2019. **7**(9): p. 204.
37. Berraondo, P., A. Teijeira, and I. Melero, *Cancer Immunosurveillance Caught in the Act*. Immunity, 2016. **44**(3): p. 525-526.
38. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018. **68**(6): p. 394-424.
39. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
40. Balmain, A., et al., *How many mutations are required for tumorigenesis? implications from human cancer data*. Molecular Carcinogenesis, 1993. **7**(3): p. 139-146.
41. Martincorena, I., et al., *Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues*. Cell, 2018. **173**(7): p. 1823.
42. Tomasetti, C., L. Li, and B. Vogelstein, *Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention*. Science, 2017. **355**(6331): p. 1330-1334.
43. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
44. Aggarwal, B.B., R.V. Vijayalekshmi, and B. Sung, *Targeting Inflammatory Pathways for Prevention and Therapy of Cancer: Short-Term Friend, Long-Term Foe*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(2): p. 425-430.
45. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
46. Mantovani, A., et al., *Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(7): p. 399-416.
47. Goswami, K.K., et al., *Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment*. Cell Immunol, 2017. **316**: p. 1-10.
48. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
49. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nature Immunology, 2010. **11**: p. 889.

50. Mantovani, A., *Reflections on immunological nomenclature: in praise of imperfection*. Nature Immunology, 2016. **17**: p. 215.
51. Sockolosky, J.T., et al., *Durable antitumor responses to CD47 blockade require adaptive immune stimulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(19): p. E2646-54.
52. Gordon, S.R., et al., *PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity*. Nature, 2017. **545**(7655): p. 495-499.
53. Troy, A.B., *Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment*. Current Drug Discovery Technologies, 2015. **12**(1): p. 3-20.
54. Marianna, Z., M. Izabela, and J. Anna, *New Molecular Targets of Anticancer Therapy – Current Status and Perspectives*. Current Medicinal Chemistry, 2016. **23**(37): p. 4176-4220.
55. Bhupinder, K., et al., *Promising Targets in Anti-cancer Drug Development: Recent Updates*. Current Medicinal Chemistry, 2017. **24**(42): p. 4729-4752.
56. Kantarjian, H., et al., *Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia*. N Engl J Med, 2002. **346**(9): p. 645-52.
57. Finn, R.S., et al., *Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer*. N Engl J Med, 2016. **375**(20): p. 1925-1936.
58. Chapman, P.B., et al., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2507-16.
59. Robert, C., et al., *Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2517-26.
60. Robert, C., et al., *Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation*. New England Journal of Medicine, 2014. **372**(4): p. 320-330.
61. Abate-Daga, D. and M.L. Davila, *CAR models: next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function*. Mol Ther Oncolytics, 2016. **3**: p. 16014.
62. Long, K.B., et al., *CAR T Cell Therapy of Non-hematopoietic Malignancies: Detours on the Road to Clinical Success*. Frontiers in Immunology, 2018. **9**(2740).
63. Cuzick, J., et al., *Estimates of benefits and harms of prophylactic use of aspirin in the general population*. Ann Oncol, 2015. **26**(1): p. 47-57.
64. Rothwell, P.M., et al., *Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials*. Lancet, 2012. **379**(9826): p. 1591-601.
65. Patrignani, P. and C. Patrono, *Aspirin and Cancer*. J Am Coll Cardiol, 2016. **68**(9): p. 967-76.
66. Sorensen, H.T., et al., *Risk of cancer in a large cohort of nonaspirin NSAID users: a population-based study*. Br J Cancer, 2003. **88**(11): p. 1687-92.
67. Levy, B.D., et al., *Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 612-9.
68. Chiang, N., et al., *Maresin 1 activates LGR6 receptor promoting phagocyte immunoresolvent functions*. The Journal of Clinical Investigation, 2019. **129**(12): p. 5294-5311.
69. Serhan, C.N. and N. Chiang, *Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(4): p. 632-40.
70. Chiang, N., et al., *Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection*. J Exp Med, 2015. **212**(8): p. 1203-17.
71. Luan, B., et al., *CREB pathway links PGE2 signaling with macrophage polarization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(51): p. 15642-7.
72. Norris, P.C., et al., *Phospholipase A2 regulates eicosanoid class switching during inflammasome activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(35): p. 12746-51.
73. Chan, M.M. and A.R. Moore, *Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 6418-26.
74. Greene, E.R., et al., *Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2011. **96**(1-4): p. 27-36.
75. Moore, G.Y. and G.P. Pidgeon, *Cross-Talk between Cancer Cells and the Tumour Microenvironment: The Role of the 5-Lipoxygenase Pathway*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(2).

76. Poczubutt, J.M., et al., *Deletion of 5-Lipoxygenase in the Tumor Microenvironment Promotes Lung Cancer Progression and Metastasis through Regulating T Cell Recruitment*. J Immunol, 2016. **196**(2): p. 891-901.
77. Ringleb, J., et al., *Apoptotic Cancer Cells Suppress 5-Lipoxygenase in Tumor-Associated Macrophages*. J Immunol, 2018. **200**(2): p. 857-868.
78. Tian, R., et al., *ALOX15 as a suppressor of inflammation and cancer: Lost in the link*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2017. **132**: p. 77-83.
79. Sulciner, M.L., et al., *Resolvins suppress tumor growth and enhance cancer therapy*. J Exp Med, 2018. **215**(1): p. 115-140.
80. Gengenbacher, N., M. Singhal, and H.G. Augustin, *Preclinical mouse solid tumour models: status quo, challenges and perspectives*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(12): p. 751-765.
81. Panigrahy, D., et al., *Preoperative stimulation of resolution and inflammation blockade eradicates micrometastases*. J Clin Invest, 2019. **129**(7): p. 2964-2979.
82. Guo, Y. and D. Nie, *Tumor-suppressing 15-lipoxygenase-2: time for prime time?* Cell Cycle, 2014. **13**(12): p. 1836-7.
83. Kapralov, A.A., et al., *Redox lipid reprogramming commands susceptibility of macrophages and microglia to ferroptotic death*. Nat Chem Biol, 2020. **16**(3): p. 278-290.
84. Tam, V.C., *Lipidomic profiling of bioactive lipids by mass spectrometry during microbial infections*. Semin Immunol, 2013. **25**(3): p. 240-8.
85. Werz, O., *5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2002. **1**(1): p. 23-44.
86. Buczynski, M.W., et al., *TLR-4 and sustained calcium agonists synergistically produce eicosanoids independent of protein synthesis in RAW264.7 cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22834-47.
87. Evans, J.H., et al., *Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30150-60.
88. Radmark, O., et al., *5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(4): p. 331-9.
89. Kihara, Y., et al., *Modeling of eicosanoid fluxes reveals functional coupling between cyclooxygenases and terminal synthases*. Biophys J, 2014. **106**(4): p. 966-75.
90. Werz, O., et al., *Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes*. Blood, 2002. **99**(3): p. 1044-1052.
91. Werz, O., et al., *Phorbol ester up-regulates capacities for nuclear translocation and phosphorylation of 5-lipoxygenase in Mono Mac 6 cells and human polymorphonuclear leukocytes*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2487-95.
92. Snodgrass, R.G. and B. Brune, *Regulation and Functions of 15-Lipoxygenases in Human Macrophages*. Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 719.
93. Bosurgi, L., et al., *Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells*. Science, 2017. **356**(6342): p. 1072-1076.
94. Brinckmann, R., et al., *Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme*. Blood, 1998. **91**(1): p. 64-74.
95. Kuhn, H., S. Banthiya, and K. van Leyen, *Mammalian lipoxygenases and their biological relevance*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(4): p. 308-30.
96. Harkewicz, R. and E.A. Dennis, *Applications of mass spectrometry to lipids and membranes*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 301-25.
97. Yang, K. and X. Han, *Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(11): p. 954-969.
98. Griffiths, W.J. and Y. Wang, *Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(7): p. 1882-96.
99. Colas, R.A., et al., *Identification and signature profiles for pro-resolving and inflammatory lipid mediators in human tissue*. Am J Physiol Cell Physiol, 2014. **307**(1): p. C39-54.

100. Vlasakov, I.N., P.; Winkler, J.; Dalli J. and Serhan C.N., *Lipid Mediator Metabololipidomics LC-MS-MS Spectra Book 2016*. 2016, Center for Experimental Therapeutics and Reperfusion Injury, Harvard Insitute of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115 U.S.A.
101. Archambault, A.S., et al., *Comparison of eight 15-lipoxygenase (LO) inhibitors on the biosynthesis of 15-LO metabolites by human neutrophils and eosinophils*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0202424.
102. Mazaleuskaya, L.L., et al., *A broad-spectrum lipidomics screen of antiinflammatory drug combinations in human blood*. JCI Insight, 2016. **1**(12).
103. Martinez, F.O., et al., *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7303-11.
104. Gerstmeier, J., et al., *An experimental cell-based model for studying the cell biology and molecular pharmacology of 5-lipoxygenase-activating protein in leukotriene biosynthesis*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(9): p. 2961-9.
105. Schievella, A.R., et al., *Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30749-54.
106. Vandenesch, F., G. Lina, and T. Henry, *Staphylococcus aureus Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors?* Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2012. **2**(12).
107. Cockeran, R., et al., *Pneumolysin potentiates production of prostaglandin E(2) and leukotriene B(4) by human neutrophils*. Infect Immun, 2001. **69**(5): p. 3494-6.
108. Scheffer, J., et al., *Bacterial adherence and hemolysin production from Escherichia coli induces histamine and leukotriene release from various cells*. Infect Immun, 1985. **50**(1): p. 271-8.
109. Konig, B., et al., *Role of Escherichia coli alpha-hemolysin and bacterial adherence in infection: requirement for release of inflammatory mediators from granulocytes and mast cells*. Infect Immun, 1986. **54**(3): p. 886-92.
110. Surette, M.E., et al., *Mechanisms of the priming effect of lipopolysaccharides on the biosynthesis of leukotriene B4 in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils*. Faseb j, 1998. **12**(14): p. 1521-31.
111. Lukic, A., et al., *GM-CSF- and M-CSF-primed macrophages present similar resolving but distinct inflammatory lipid mediator signatures*. The FASEB Journal, 2017. **31**(10): p. 4370-4381.
112. Dalli, J., et al., *Maresin conjugates in tissue regeneration biosynthesis enzymes in human macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(43): p. 12232-12237.
113. Meirer, K., D. Steinhilber, and E. Proschak, *Inhibitors of the arachidonic acid cascade: interfering with multiple pathways*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2014. **114**(1): p. 83-91.
114. Hinz, C., S. Liggi, and J.L. Griffin, *The potential of Ion Mobility Mass Spectrometry for high-throughput and high-resolution lipidomics*. Curr Opin Chem Biol, 2018. **42**: p. 42-50.
115. Koeberle, A. and O. Werz, *Perspective of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 as drug target in inflammation-related disorders*. Biochem Pharmacol, 2015. **98**(1): p. 1-15.
116. Cheung, S.Y., et al., *Discovery of a benzenesulfonamide-based dual inhibitor of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase that favorably modulates lipid mediator biosynthesis in inflammation*. Eur J Med Chem, 2018. **156**: p. 815-830.
117. Pettersen, D., O. Davidsson, and C. Whatling, *Recent advances for FLAP inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2015. **25**(13): p. 2607-12.
118. Mandal, A.K., et al., *The nuclear membrane organization of leukotriene synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(51): p. 20434-9.

119. Gerstmeier, J., et al., *Time-resolved in situ assembly of the leukotriene-synthetic 5-lipoxygenase/5-lipoxygenase-activating protein complex in blood leukocytes*. *Faseb j*, 2016. **30**(1): p. 276-85.
120. Fischer, L., et al., *Phosphorylation- and stimulus-dependent inhibition of cellular 5-lipoxygenase activity by nonredox-type inhibitors*. *Faseb j*, 2003. **17**(8): p. 949-51.
121. Werz, O. and D. Steinhilber, *Development of 5-lipoxygenase inhibitors--lessons from cellular enzyme regulation*. *Biochem Pharmacol*, 2005. **70**(3): p. 327-33.
122. Falgoutyret, J.P., J.H. Hutchinson, and D. Riendeau, *Criteria for the identification of non-redox inhibitors of 5-lipoxygenase*. *Biochem Pharmacol*, 1993. **45**(4): p. 978-81.
123. Gilbert, N.C., et al., *The Structure of Human 5-Lipoxygenase*. *Science*, 2011. **331**(6014): p. 217-219.
124. Gilbert, N.C., et al., *Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products*. *Nature Chemical Biology*, 2020.
125. Lehmann, C., et al., *Lipoxin and resolvin biosynthesis is dependent on 5-lipoxygenase activating protein*. *Faseb j*, 2015. **29**(12): p. 5029-43.
126. Luo, M., et al., *Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B<sub>4</sub> synthetic capacity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p. 12165-70.
127. Fredman, G., et al., *Resolvin D1 limits 5-lipoxygenase nuclear localization and leukotriene B<sub>4</sub> synthesis by inhibiting a calcium-activated kinase pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(40): p. 14530-5.
128. Fredman, G., et al., *An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 12859.
129. Claesson, H.E., *On the biosynthesis and biological role of eoxins and 15-lipoxygenase-1 in airway inflammation and Hodgkin lymphoma*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2009. **89**(3-4): p. 120-5.
130. Han, H., et al., *Human 15-lipoxygenase-1 is a regulator of dendritic-cell spreading and podosome formation*. *Faseb j*, 2017. **31**(2): p. 491-504.
131. Uderhardt, S., et al., *12/15-lipoxygenase orchestrates the clearance of apoptotic cells and maintains immunologic tolerance*. *Immunity*, 2012. **36**(5): p. 834-46.
132. O'Donnell, V.B., et al., *Enzymatically oxidized phospholipids assume center stage as essential regulators of innate immunity and cell death*. *Sci Signal*, 2019. **12**(574).
133. Kutzner, L., et al., *Mammalian ALOX15 orthologs exhibit pronounced dual positional specificity with docosahexaenoic acid*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017. **1862**(7): p. 666-675.
134. Charleson, S., et al., *Structural requirements for the binding of fatty acids to 5-lipoxygenase-activating protein*. *Eur J Pharmacol*, 1994. **267**(3): p. 275-80.
135. Petrich, K., et al., *The suppression of 5-lipoxygenation of arachidonic acid in human polymorphonuclear leucocytes by the 15-lipoxygenase product (15S)-hydroxy-(5Z,8Z,11Z,13E)-eicosatetraenoic acid: structure-activity relationship and mechanism of action*. *Biochem J*, 1996. **314** ( Pt 3): p. 911-6.
136. Meng, H., et al., *Discovery of Novel 15-Lipoxygenase Activators To Shift the Human Arachidonic Acid Metabolic Network toward Inflammation Resolution*. *J Med Chem*, 2016. **59**(9): p. 4202-9.
137. Kokotou, M.G., et al., *Inhibitors of phospholipase A2 and their therapeutic potential: an update on patents (2012-2016)*. *Expert Opin Ther Pat*, 2017. **27**(2): p. 217-225.
138. Murakami, M., *Lipoquality control by phospholipase A2 enzymes*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2017. **93**(9): p. 677-702.
139. Dennis, E.A., et al., *Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention*. *Chem Rev*, 2011. **111**(10): p. 6130-85.
140. Shikano, M., et al., *Complete discrimination of docosahexaenoate from arachidonate by 85 kDa cytosolic phospholipase A2 during the hydrolysis of diacyl- and alkenylacylglycerophosphoethanolamine*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1212**(2): p. 211-6.

141. Miki, Y., et al., *Lymphoid tissue phospholipase A2 group IID resolves contact hypersensitivity by driving antiinflammatory lipid mediators*. J Exp Med, 2013. **210**(6): p. 1217-34.
142. Kuhn, H., et al., *Formation of lipoxin B by the pure reticulocyte lipoxygenase via sequential oxygenation of the substrate*. Eur J Biochem, 1987. **169**(3): p. 593-601.
143. Poczubutt, J.M., et al., *Eicosanoid profiling in an orthotopic model of lung cancer progression by mass spectrometry demonstrates selective production of leukotrienes by inflammatory cells of the microenvironment*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79633.
144. Koeberle, S.C., et al., *Skepinone-L is a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor*. Nat Chem Biol, 2011. **8**(2): p. 141-3.
145. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911-1912.
146. Wculek, S.K. and I. Malanchi, *Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells*. Nature, 2015. **528**(7582): p. 413-7.
147. Nosaka, T., et al., *Alveolar Macrophages Drive Hepatocellular Carcinoma Lung Metastasis by Generating Leukotriene B4*. J Immunol, 2018. **200**(5): p. 1839-1852.
148. Wen, Z., et al., *Increased metabolites of 5-lipoxygenase from hypoxic ovarian cancer cells promote tumor-associated macrophage infiltration*. Oncogene, 2015. **34**(10): p. 1241-52.
149. Ratner, A.J., et al., *Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins*. J Biol Chem, 2006. **281**(18): p. 12994-8.
150. Kloft, N., et al., *Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **385**(4): p. 503-6.
151. Hashemi Goradel, N., et al., *Cyclooxygenase-2 in cancer: A review*. Journal of Cellular Physiology, 2019. **234**(5): p. 5683-5699.

## **EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Fakultät der Biowissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist. Die vorliegende Dissertation habe ich selbst angefertigt, keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Dissertation wurde für keine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung als Prüfungsarbeit von mir eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Universität als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 27.05.2020

---

Ort, Datum

---

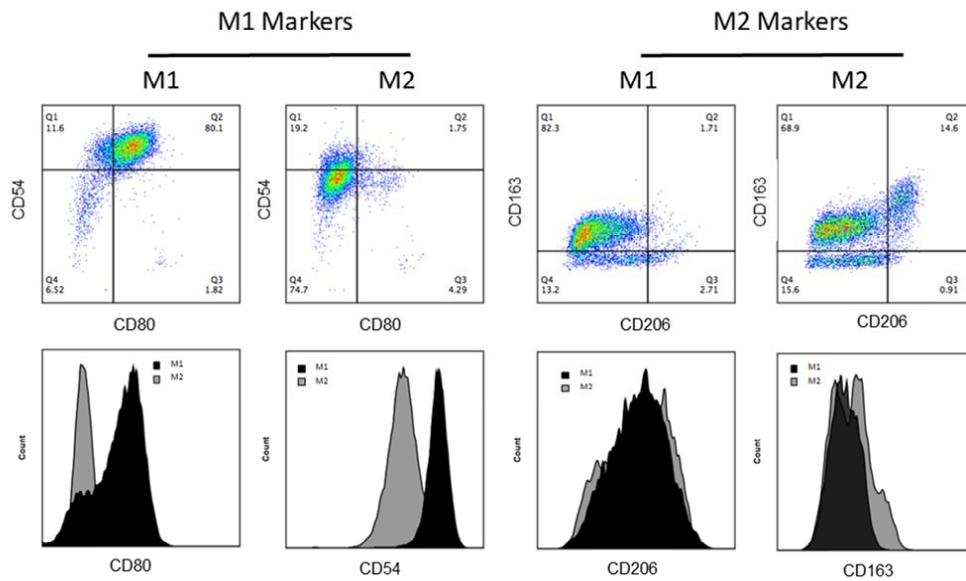
Markus Werner



## APPENDIX 1: ERGÄNZENDE INFORMATIONEN

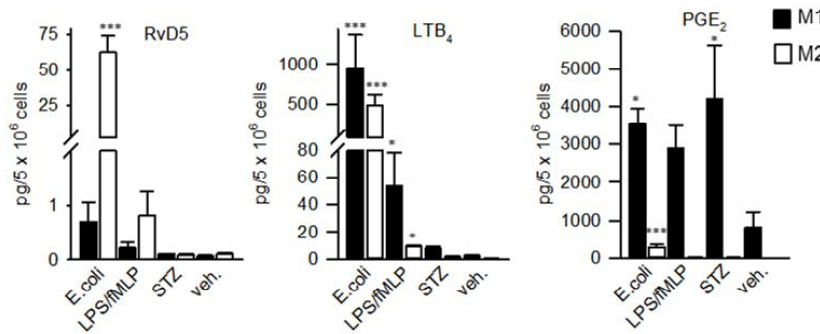
## APPENDIX 1.1 Ergänzende Informationen zu Manuskript I

Supplementary Figure 1



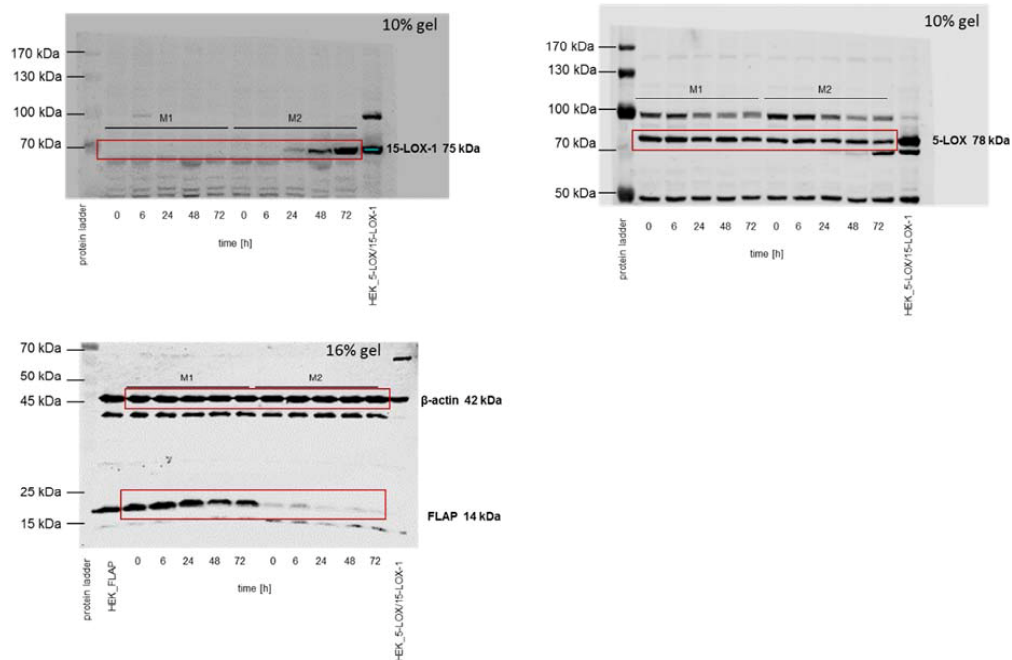
**Supplementary Fig. 1. Assessment of macrophage polarization.** Human monocytes were differentiated by GM-CSF or M-CSF (20 ng/ml, each) for 6 days to obtain M0<sub>GM-CSF</sub> or M0<sub>M-CSF</sub>, respectively. Cells were either polarized with 100 ng/ml LPS plus 20 ng/ml IFN- $\gamma$  to obtain M1, or with 20 ng/ml IL-4 to obtain M2. After 48 h, cells were analyzed for surface expression of polarization markers by flow cytometry. Results are representative for at least three experiments.

## Supplementary Figure 2



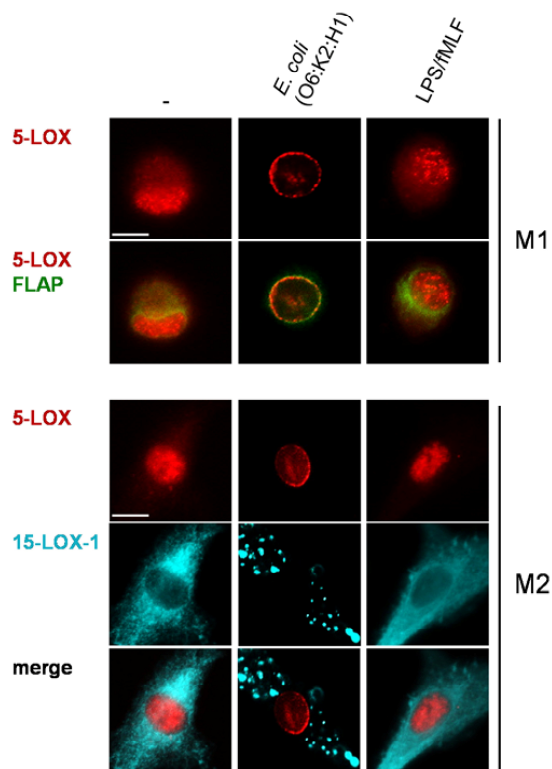
**Supplementary Fig. 2. Lipid mediator formation in M1 and M2 in response to different stimuli.** Human monocyte-derived macrophages were polarized for 24 h to M1 and M2. Cells ( $5 \times 10^6$  cells/ml PBS+Ca/Mg) were incubated at 37 °C for 60 min with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50), 100 ng/ml LPS plus 100 nM fMLF, 100 ng/ml serum-treated zymosan (STZ) or vehicle-treated (veh). Formed lipid mediators were isolated by SPE and analyzed by LC-MS-MS. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  versus vehicle control (veh.); data were log-transformed for statistical analysis using one-way ANOVA with Bonferroni Multiple Comparison Test.

Supplementary Figure 3



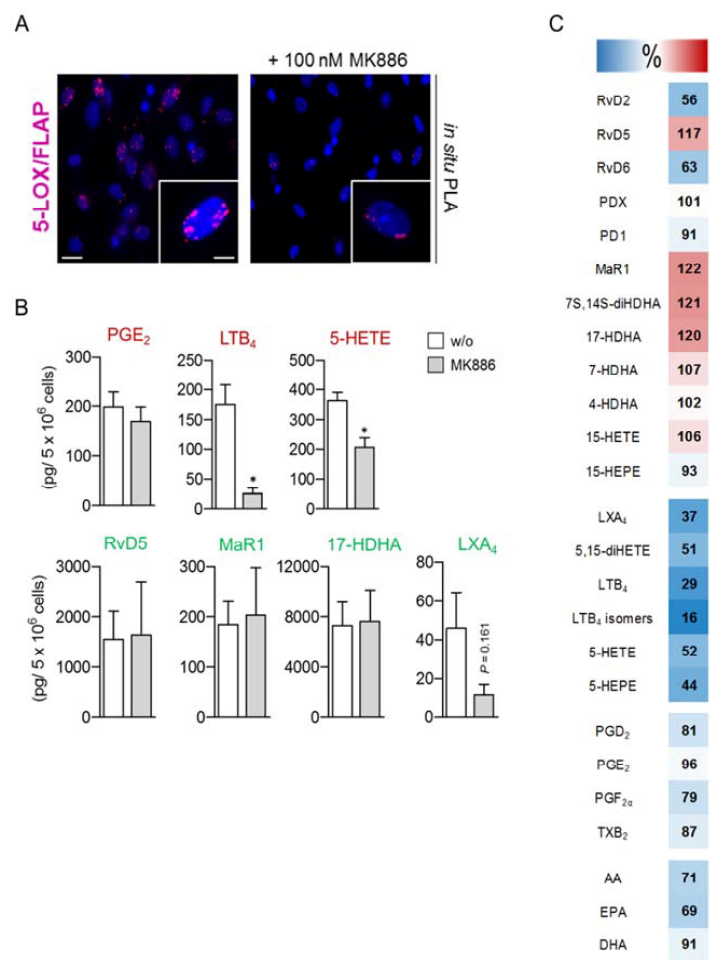
**Supplementary Fig. 3. Scans of Western blots shown in Figure 3B.** Molecular weight markers are indicated. Red boxes highlight the lanes that are displayed in the corresponding figures.

Supplementary Figure 4



**Supplementary Fig. 4. Effects of *E. coli* or LPS/fMLF on the subcellular localization of LOXs.** Human M1 or M2 ( $1 \times 10^6$  cells/ml PBS+Ca/Mg) were incubated with or without *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50) for 90 min or with LPS (100 ng/ml) 30 min before further stimulation with fMLF (100 nM, 90 min) at 37 °C. Then, cells were fixed, permeabilized, and incubated with antibodies against 5-LOX (red), FLAP (green) or 15-LOX-1 (cyan-blue); scale bars = 10  $\mu$ m. Results shown for one single cell are representative for approximately 100 individual cells analyzed in  $n = 3$  independent experiments (separate donors), each.

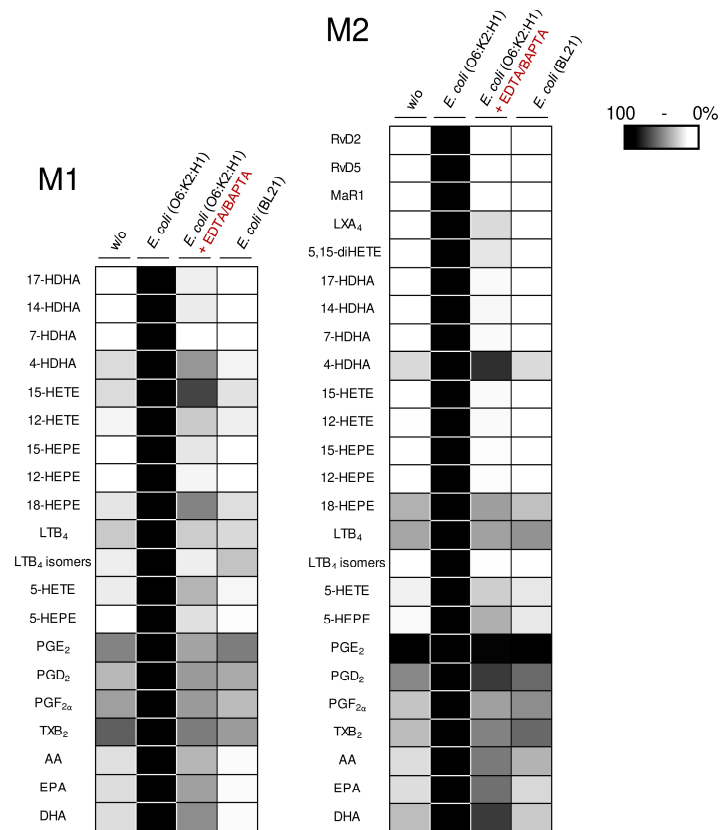
Supplementary Figure 5



**Supplementary Fig. 5. Effects of the FLAP inhibitor MK886 on lipid mediator biosynthesis in M2.** (A) Effects of MK886 on the 5-LOX/FLAP complex assembly. M2 ( $1 \times 10^6$  cells/ml PBS+Ca/Mg) were preincubated with 100 nM MK886 or vehicle (0.1% DMSO) for 15 min at 37 °C, and then incubated with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50) for another 90 min. 5-LOX/FLAP complexes (magenta dots) were analyzed by proximity ligation assay (PLA); DAPI (blue) was used to stain the nucleus; scale bars = 5  $\mu$ m (insets) and 15  $\mu$ m (overview). Results shown for one single cell (insets) are representative for approximately 100 individual cells analyzed in  $n = 3$  independent experiments (separate donors), each. (B,C) M2

( $5 \times 10^6$  cells/ml PBS+Ca/Mg) were preincubated with 100 nM MK886 or vehicle (w/o, 0.1% DMSO) for 15 min at 37 °C, and then incubated with *E. coli* (ratio = 1:50) for another 90 min. Formed LM were extracted by SPE and analyzed by LC-MS-MS. (B) Selected LM and effects of MK886 on LM formation. Data are given as means  $\pm$  S.E.M,  $n = 3$ . \*,  $p < 0.05$  versus vehicle control as determined by two-tailed t test. (C) Effects of MK886 on the LM signature profile. Results are given as percentage of vehicle-treated M2 (= 100% control, white) and are shown as heat map,  $n = 3$ .

Supplementary Figure 6



**Supplementary Fig. 6. Role of Ca<sup>2+</sup> and pathogenicity for bacteria-stimulated lipid mediator (LM) formation in M1 and M2.** M1 or M2 ( $5 \times 10^6$  cells/ml) were incubated at 37 °C for 90 min with or without *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50) in PBS+Ca/Mg or in PBS containing 0.5 mM EDTA and 20 μM BAPTA/AM, or with the non-pathogenic *E. coli* strain BL21 (ratio = 1:50). Formed LM were isolated by SPE and analyzed by LC-MS/MS. Results are given as percentage of *E. coli* (O6:K2:H1)-stimulated cells treated in PBS+Ca/Mg (= 100% control, black) and shown as heat map,  $n = 3$ .



Supplementary Table 1

DHA bioactive metabolome	Q1	Q3	M1		M2	
			w/o	+ <i>E. coli</i>	w/o	+ <i>E. coli</i>
RvD1	375	121	-	-	-	2.8 ± 0.9
RvD2	375	215	-	1.6 ± 0.5	0.6 ± 0.1	83.2 ± 31.4
RvD5	359	199	-	4.7 ± 1.4	-	461.9 ± 93.4
RvD6	359	101	-	0.8 ± 0.4	-	4.5 ± 0.5
AT-RvD1	375	215	-	1.0 ± 0.4	-	5.4 ± 2.8
PD1	359	153	-	-	-	7.7 ± 0.7
AT-PD1	359	153	-	-	-	17.0 ± 2.5
10S,17S-diHDHA	359	153	-	-	-	53.8 ± 27.5
MaR1	359	221	-	2.1 ± 0.3	-	84.0 ± 21.7
7S,14S-diHDHA	359	221	-	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.4	82.0 ± 18.3
4S,14S-diHDHA	359	101	-	-	-	15.3 ± 4.7
17-HDHA	343	245	3.1 ± 2.1	80.4 ± 30.7	4.1 ± 2.9	1801.2 ± 627.6
14-HDHA	343	205	-	32.5 ± 12.4	0.5 ± 0.1	646.2 ± 80.8
7-HDHA	343	141	-	59.1 ± 28.5	-	141.0 ± 27.9
4-HDHA	343	101	0.6 ± 0.1	22.5 ± 4.7	1.1 ± 0.4	33.6 ± 7.4
<b>EPA bioactive metabolome</b>						
RvE1	349	195	-	0.5 ± 0.4	-	0.5 ± 0.2
RvE2	333	253	1.2 ± 0.2	2.4 ± 1.0	3.0 ± 1.5	5.8 ± 2.7
RvE3	333	201	1.1 ± 0.3	9.7 ± 4.4	2.8 ± 0.8	15.6 ± 7.8
18-HEPE	317	259	1.0 ± 0.1	7.6 ± 0.6	2.7 ± 0.9	17.0 ± 3.9
15-HEPE	317	219	-	15.8 ± 3.8	1.5 ± 0.8	1033.9 ± 403.1
12-HEPE	317	179	-	13.2 ± 4.7	-	147.1 ± 33.8
5-HEPE	317	115	-	177.5 ± 111.9	0.7 ± 0.2	51.5 ± 18.2

Supplementary Table 1. Biosynthesis of the DHA and EPA metabolome in M1 and M2.

Human monocyte-derived macrophages were polarized for 48 h to M1 and M2. Cells ( $5 \times 10^6$  cells/ml PBS+Ca/Mg) were incubated for 90 min with or without (w/o) *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50) at 37 °C. Formed lipid mediators were isolated by SPE and analyzed by LC-MS-MS. Lipid mediator profile of M1 and M2; detection limit: 0.5 pg. Data are given as means ± S.E.M.,  $n = 7$ .

Supplementary Table 2

AA bioactive metabolome	Q1	Q3	M1		M2	
			w/o	+ <i>E. coli</i>	w/o	+ <i>E. coli</i>
LXA <sub>4</sub>	351	115	-	3.6 ± 2.0	-	30.2 ± 15.7
AT-LXA <sub>4</sub>	351	115	-	4.4 ± 1.5	-	21.5 ± 4.1
5,15-di-HETE	335	115	-	32.9 ± 16.7	0.7 ± 0.2	663.4 ± 283.0
LTB <sub>4</sub>	335	195	0.6 ± 0.3	1188.2 ± 639.2	-	239.9 ± 136.9
20-OH-LTB <sub>4</sub>	351	195	-	5.7 ± 2.6	-	3.0 ± 2.1
PGD <sub>2</sub>	351	189	3.9 ± 1.8	172.7 ± 29.2	22.2 ± 12.1	379.2 ± 165.7
PGE <sub>2</sub>	351	189	337.2 ± 242.8	13,525.2 ± 4380.9	15.5 ± 6.7	411.2 ± 106.1
PGF <sub>2a</sub>	351	193	66.7 ± 31.8	1116.6 ± 181.6	9.7 ± 4.2	615.8 ± 150.7
TXB <sub>2</sub>	369	169	419.1 ± 220.4	4447.6 ± 1452.1	312.4 ± 148.7	5946.9 ± 863.9
15-HETE	319	219	1.2 ± 0.2	384.4 ± 96.7	3.3 ± 1.3	3780.3 ± 552.2
12-HETE	319	179	0.5 ± 0.2	97.6 ± 46.4	0.9 ± 0.2	552.8 ± 112.3
5-HETE	319	115	0.7 ± 0.2	984.4 ± 583.7	1.8 ± 0.2	592.3 ± 245.0

**Supplementary Table 2. Biosynthesis of the AA metabolome in M1 and M2.** Human monocyte-derived macrophages were polarized for 48 h to M1 and M2. Cells ( $5 \times 10^6$  cells/ml PBS+Ca/Mg) were incubated for 90 min with or without (w/o) *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50) at 37 °C. Formed lipid mediators were isolated by SPE and analyzed by LC-MS-MS. Lipid mediator profile of M1 and M2; detection limit: 0.5 pg. Data are given as means ± S.E.M.,  $n = 7$ .

**Supplementary Table 3**

Substrates/ fatty acids	Q1	Q3	M1		M2	
			w/o	+ <i>E. coli</i>	w/o	+ <i>E. coli</i>
AA	303	259	492 ± 106	12,762 ± 3298	879 ± 171	9039 ± 2493
EPA	301	257	112 ± 34	2509 ± 271	170 ± 40	3302 ± 781
DHA	327	283	1782 ± 365	11,233 ± 4024	1651 ± 213	15,632 ± 5473

**Supplementary Table 3. Fatty acid substrate release from M1 and M2.** Human monocyte-derived macrophages were polarized for 48 h to M1 and M2. Cells ( $5 \times 10^6$  cells/ml PBS+Ca/Mg) were incubated for 90 min with or without (w/o) *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50) at 37 °C. Released fatty acids were isolated by SPE and analyzed by LC-MS-MS. Lipid mediator profile of M1 and M2; detection limit: 0.5 pg. Data are given as means ± S.E.M.,  $n = 7$ .

## **APPENDIX 1.2 Ergänzende Informationen zu Manuskript II**

### **Supplemental Data**

#### **Targeting biosynthetic networks of the pro-inflammatory and pro-resolving lipid metabolome**

Markus Werner, Paul M. Jordan, Erik Rømp, Anna Czapka, Zhigang Rao, Christian Kretzer, Andreas Koeberle, Ulrike Garscha, Simona Pace, Hans-Erik Claesson, Charles N. Serhan, Oliver Werz and Jana Gerstmeier

**Content:** Supplemental Tables 1-4

Supplemental Figure 1-2

**Supplemental Table 1. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) settings****Acquity™ UPLC system settings**

Solvent A	H <sub>2</sub> O (0.01% acetic acid)	
Solvent B	Methanol (0.01% acetic acid)	
Flow rate	0.3 ml/min	
Column	Acquity UPLC BEH C18 1.7 µM; 2.1 × 100 mm	
Column heater temperature	50 °C	
Gradient	Time (min)	Solvent % B
	0.0	42
	12.5	86
	12.5	98
	15.5	98
	15.5	42
	16	42

**Supplemental Table 2. Mass spectrometer settings for multiple reaction monitoring****AB Sciex 5500 QTRAP MS settings for multiple reaction monitoring**

---

Curtain gas	35
Collision gas	Medium
Ion spray voltage	-4000 eV
Temperature	500 °C
Ion source gas 1	40
Ion source gas 2	40

---

Supplemental Table 3. MRM transitions of lipid mediators used for quantitation and their retention times

diagnostic ion	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP	RT [min]	y = m · x [pg] [m · 10 <sup>5</sup> =]	r <sup>2</sup>	LOD [pg / 10 µl]
<b>5-LOX</b>										
5-HETE	319.2	115.1	-80	-10	-21	-12	12.1	4.451	0.9994	1.560
5-HEPE	317.2	115.1	-80	-10	-18	-12	11.2	4.877	0.9992	1.560
t-LTB <sub>4</sub>	335.2	195.1	-80	-10	-22	-13	8.7	4.057	0.9992	1.560
LTB <sub>4</sub>	335.2	195.1	-80	-10	-22	-13	9.2	4.202	0.9998	0.780
5S,6R-diHETE	335.2	115.1	-80	-10	-20	-13	10.6	5.246	0.9990	0.390
<b>COX</b>										
PGE <sub>2</sub>	351.3	189.1	-80	-10	-25	-14	6.1	10.10	0.9990	0.195
PGD <sub>2</sub>	351.3	233.1	-80	-10	-16	-15	6.3	5.004	0.9993	0.195
PGF <sub>2a</sub>	353.3	193.1	-80	-10	-34	-11	6.5	8.900	0.9991	0.390
TXB <sub>2</sub>	369.3	169.1	-80	-10	-22	-15	5.8	2.930	0.9996	0.390
11-HETE	319.2	167.1	-80	-10	-21	-12	11.6	1.713	0.9997	0.390
11-HEPE	317.2	167.1	-80	-10	-19	-12	10.7	3.984	0.9994	1.560
<b>SPM precursor</b>										
14-HDHA	343.2	205.1	-80	-10	-17	-14	11.7	13.32	0.9999	1.560
7-HDHA	343.2	141.1	-80	-10	-18	-15	11.9	8.024	0.9997	1.560
4-HDHA	343.2	101.1	-80	-10	-17	-15	12.4	6.159	0.9998	3.125
15-HETE	319.2	219.1	-80	-10	-19	-12	11.4	11.39	0.9996	1.560
12-HETE	319.2	179.1	-80	-10	-21	-12	11.7	4.846	0.9994	1.560
5,15-diHETE	335.2	201	-50	-10	-30	-13	8.8	12.74	0.9991	3.125
15-HEPE	317.2	219.1	-80	-10	-18	-12	10.7	6.065	0.9992	1.560
12-HEPE	317.2	179.1	-80	-10	-19	-12	10.8	4.897	0.9994	1.560
<b>SPM</b>										
18-HEPE	317.2	259.1	-80	-10	-16	-23	10.5	8.482	0.9993	1.560
RvE3	333.3	201.2	-80	-10	-20	-12	8.9	—	—	—
17-HDHA	343.2	245.1	-80	-10	-17	-14	11.5	23.86	0.9999	6.250
10S,17S-diHDHA	359.2	153.1	-80	-10	-21	-9	8.8	3.670	0.9994	0.195
PD1	359.2	153.1	-80	-10	-21	-9	8.8	3.670	0.9994	0.195
AT-PD1	359.2	153.1	-80	-10	-21	-9	8.8	3.670	0.9994	0.195
MaR1	359.2	250.1	-80	-10	-20	-16	9.1	30.58	0.9997	0.780
RvD2	375.2	175.1	-80	-10	-30	-13	6.4	15.72	0.9989	1.560
RvD4	375.2	101.1	-80	-10	-22	-10	7.8	11.63	0.9993	0.195
RvD5	359.2	199.1	-80	-10	-21	-13	8.9	8.138	0.9996	0.390
LXA <sub>4</sub>	351.2	115.1	-80	-10	-20	-13	6.9	5.702	0.9987	0.195
<b>FA</b>										
AA	303.3	259.1	-100	-10	-16	-18	13.8	71.55	0.9993	62.5
EPA	301.3	257.1	-100	-10	-16	-18	13.6	36.02	0.9996	31.25
DHA	327.3	283.1	-100	-10	-16	-18	13.8	64.02	0.9502	125

DP=Declustering Potential, EP=Entrance Potential, CE=Collision Energy, CXP=Collision Cell Exit Potential, RT=Retention Time, linear equation, coefficient of determination (r<sup>2</sup>) and limit of detection (LOD). LOD represents the lowest concentration of the standard curves showing a peak with more than five data points and signal to noise ratio higher than three (Means ± SEM, n=3).

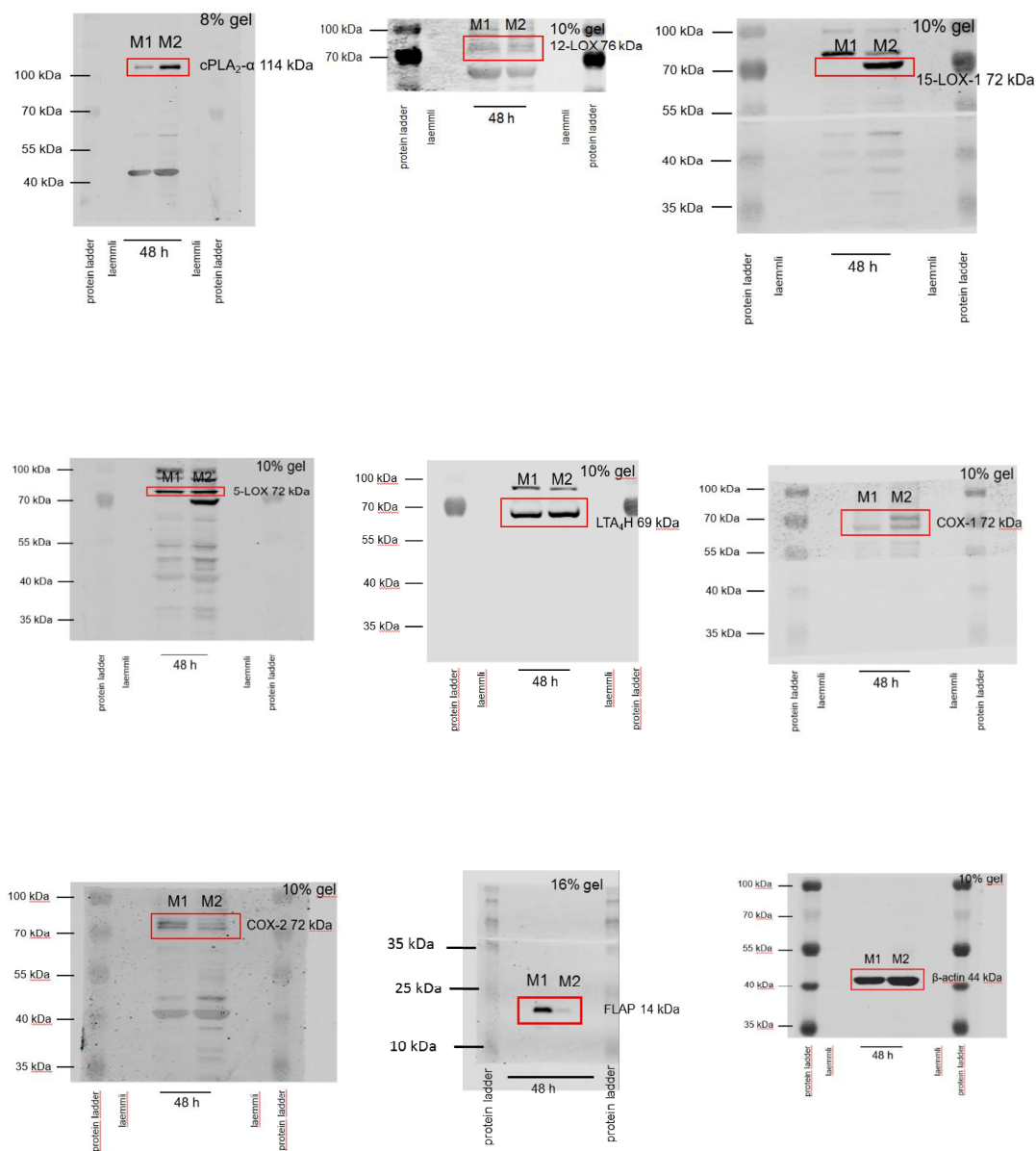


Supplemental Table 4. LM biosynthesis in M1 and M2 macrophages upon exposure to pathogenic *E. coli*

	M1			M2		
	veh.	+ <i>E. Coli</i>		veh.	+ <i>E. Coli</i>	
5-HETE	-	1623	± 310	-	1157	± 166
5-HEPE	-	299	± 73	-	175	± 36
t-LTB <sub>4</sub>	-	256	± 65	-	296	± 34
LTB <sub>4</sub>	-	1684	± 358	-	643	± 129
5S,6R-diHETE	-	83	± 16	-	55	± 10
PGE <sub>2</sub>	804 ± 188	13,960	± 1801	31 ± 17	689	± 51
PGD <sub>2</sub>	14 ± 3.1	221	± 37	8.8 ± 4.0	237	± 28
PGF <sub>2α</sub>	48 ± 13	811	± 94	8.2 ± 1.5	541	± 91
TXB <sub>2</sub>	762 ± 152	8370	± 914	280 ± 77	15,804	± 1345
11-HETE	-	2742	± 323	-	2695	± 267
11-HEPE	-	54	± 5.4	-	94	± 11
14-HDHA	-	61	± 10	-	4031	± 441
7-HDHA	-	98	± 20	-	453	± 42
4-HDHA	-	67	± 7.6	-	115	± 9.4
15-HETE	21 ± 4.3	1273	± 140	29 ± 14	41,468	± 4739
12-HETE	-	129	± 23	-	2965	± 341
5,15-diHETE	-	-	-	-	1712	± 235
15-HEPE	-	54	± 7.8	-	6952	± 1011
12-HEPE	-	27	± 7.5	-	1441	± 296
18-HEPE	-	41	± 4.6	-	140	± 14
RvE3	-	-	-	-	218	± 38
17-HDHA	-	414	± 53	-	25,289	± 2930
10S,17S-diHDHA	-	-	-	-	42	± 5.4
PD1	-	-	-	-	253	± 30
AT-PD1	-	-	-	-	306	± 38
MaR1	-	-	-	-	548	± 106
RvD2	-	-	-	-	177	± 27
RvD4	-	-	-	-	28	± 3.8
RvD5	-	-	-	-	1790	± 276
LXA <sub>4</sub>	-	-	-	-	54	± 15
AA	1650 ± 193	520,540	± 129,749	2341 ± 489	695,267	± 157,048
EPA	397 ± 61	165,472	± 28,706	548 ± 124	292,667	± 34,385
DHA	1604 ± 208	261,669	± 29,475	3256 ± 362	357,654	± 36,136

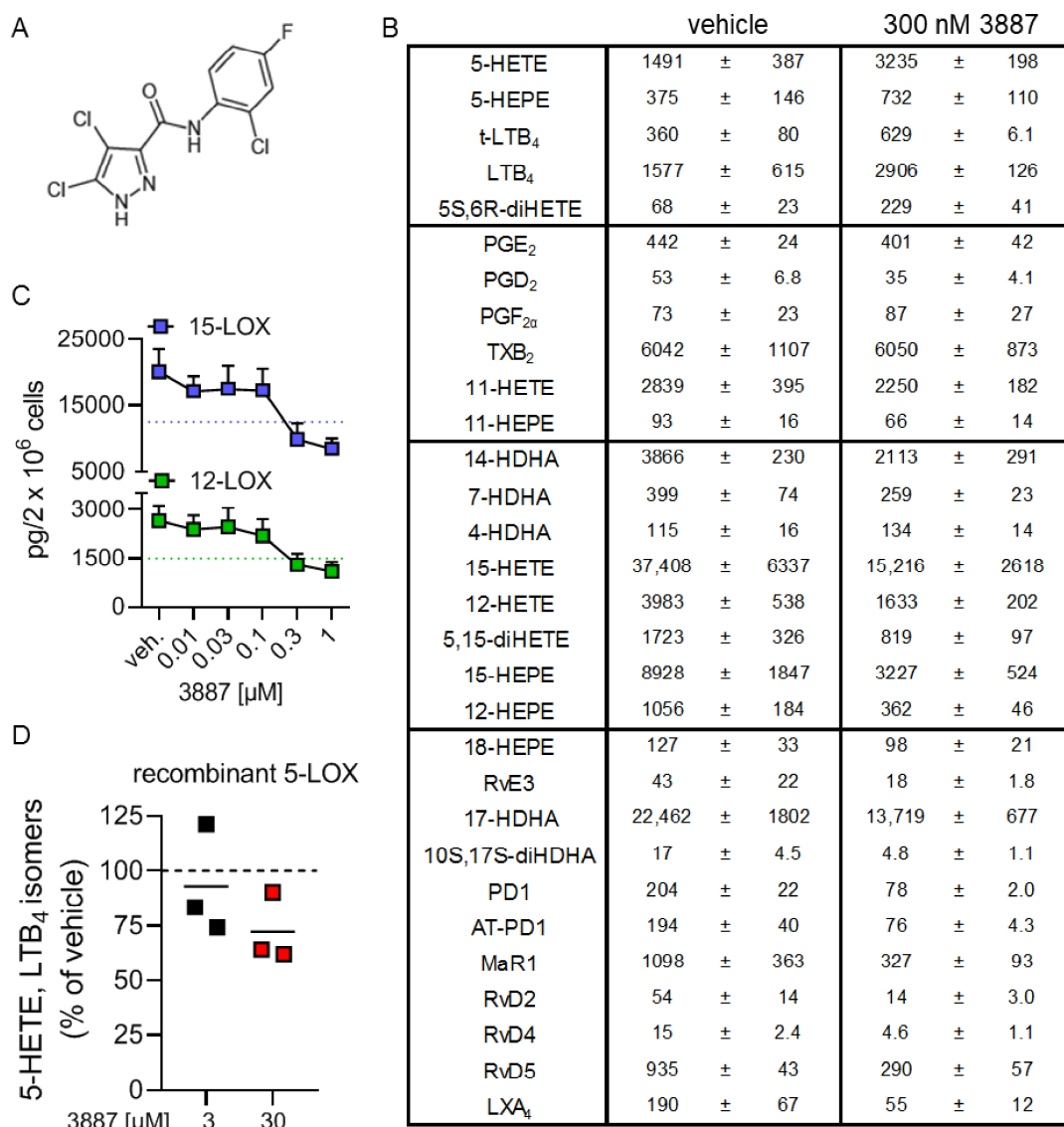
Human monocyte-derived macrophages were polarized for 48 hrs to M1 and M2 ( $2 \times 10^6$  cells/ml) and incubated for 180 min with vehicle or *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50) at 37 °C. Formed LM were isolated by SPE and analyzed by UPLC-MS/MS, LOD according to Suppl Table 3. Data are given as means ± S.E.M. as pg/2 × 10<sup>6</sup> cells, n=4 for vehicle control in M1/M2 and for *E.coli* challenge in M1: n = 24-34 and in M2: n = 33-39.

Supplemental Figure 1



**Figure S1. Representative full scan of Western blots shown in Figure 1C.** Molecular weight markers are indicated on the left. Red boxes highlight the lanes that are displayed in the corresponding figures.

Supplemental Figure 2



**Figure S2. Effect of the 15-LOX-1 inhibitor 3887 on the lipid mediator profil.** (A) Chemical structure of 3887. (B) LM profile in M2 macrophages, shown as  $\text{pg}/2 \times 10^6$  cells of  $n = 3$ , corresponding to the heatmap in Figure 4A as mean + S.E.M.. (C) Concentration-dependent inhibition of mono-hydroxylated 15-LOX products (15-HETE, 15-HEPE and 17-HDHA) and 12-LOX products (12-HETE, 12-HEPE and 14-HDHA) in M2 macrophages. Data are given as mean + S.E.M. of  $n = 3$  independent experiments, shown as  $\text{pg}/2 \times 10^6$  M2. (D) Purified 5-LOX enzyme was preincubated with 3 and 30  $\mu\text{M}$  3887 before stimulation with 20  $\mu\text{M}$  exogenous AA for 5-LOX product formation, analyzed by HPLC. Data are given as mean + single values of  $n = 3$  independent experiments, shown as percentage of vehicle control (= 100%).

## APPENDIX 1.3 Ergänzende Informationen zu Manuskript III

### Supplementary Information

**Communication between human macrophages and epithelial cancer cell lines dictates lipid mediator biosynthesis**

**Cellular and Molecular Life Sciences**

Markus Werner, Simona Pace, Anna Czapka, Paul Jordan, Jana Gerstmeier, Andreas Koeberle, Oliver Werz

**Correspondence:** Prof. Dr. Oliver Werz, Department of Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Friedrich-Schiller-University Jena, Philosophenweg 14, 07743 Jena, Germany; E-mail: [oliver.werz@uni-jena.de](mailto:oliver.werz@uni-jena.de)

**Content:** Online Resource 1-3

## Online Resource 1

		MDM [pg]	MDM <sub>A549</sub> [pg]
COX	PGE <sub>2</sub>	282 ± 61	514 ± 90
	PGD <sub>2</sub>	106 ± 18	133 ± 18
	PGF <sub>2α</sub>	418 ± 57	482 ± 27
	TXB <sub>2</sub>	7772 ± 1235	9467 ± 1198
	11-HETE	1611 ± 332	2159 ± 377
	11-HEPE	40 ± 16	45 ± 11
5-LO/FLAP	5-HETE	1577 ± 265	3089 ± 561
	5-HEPE	221 ± 33	337 ± 53
	LTB <sub>4</sub>	1241 ± 539	2229 ± 310
	t-LTB <sub>4</sub>	511 ± 255	674 ± 125
	5S,6R-diHETE	89 ± 37	148 ± 27
mono/di-hydroxylated FA	14-HDHA	1030 ± 192	1450 ± 319
	7-HDHA	207 ± 15	250 ± 38
	4-HDHA	38 ± 3	23 ± 3
	15-HETE	17,875 ± 4739	25,696 ± 4931
	12-HETE	1620 ± 378	2389 ± 388
	5,15-diHETE	2139 ± 1256	2851 ± 655
	15-HEPE	2804 ± 1146	3188 ± 809
	12-HEPE	290 ± 107	319 ± 79
	5,15-diHEPE	39 ± 13	47 ± 9
bioactive SPM	18-HEPE	51 ± 14	62 ± 12
	RvE3	235 ± 113	284 ± 57
	17-HDHA	6241 ± 998	8420 ± 1506
	PDX	10 ± 3	11 ± 3
	MaR1	230 ± 72	263 ± 77
	RvD2	52 ± 26	60 ± 26
	RvD4	4 ± 3	5 ± 4
	RvD5	655 ± 256	761 ± 227
fatty acids	LXA <sub>4</sub>	37 ± 23	46 ± 8
	AA	90,535 ± 11,746	124,218 ± 23,663
	EPA	105,623 ± 21,498	104,369 ± 23,873
	DHA	72,063 ± 9722	73,215 ± 12,888

**LM biosynthesis in MDM monocultures and in cocultures of MDM with A549 cells.**

MDM ( $2 \times 10^6$  cells) in monocultures or in cocultures with  $2 \times 10^6$  A549 cells were treated with IL-4 for 48 hrs in a Boyden chamber. MDM were then separated from A549. MDM were challenged with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50) for 90 min. Released LMs were extracted from the medium and analyzed by UPLC-MS/MS. Data are given in pg per  $2 \times 10^6$  MDM; mean  $\pm$  S.E.M;  $n = 7$ .

## Online Resource 2

0 100 ≥300%		MDM + DMSO	MDM + Skep-L	[%]	MDM <sub>A549</sub> + DMSO	MDM <sub>A549</sub> + Skep-L	[%]
COX	PGE <sub>2</sub>	289 ± 113	264 ± 104	91	689 ± 190	594 ± 87	86
	PGD <sub>2</sub>	114 ± 29	106 ± 27	92	180 ± 29	141 ± 6	79
	PGF <sub>2α</sub>	447 ± 109	369 ± 82	83	578 ± 147	427 ± 39	74
	TXB <sub>2</sub>	28,033 ± 10,447	26,412 ± 8864	94	34,297 ± 11,780	28,417 ± 3655	83
	11-HETE	342 ± 50	311 ± 49	91	596 ± 101	510 ± 53	86
5-LO/FLAP	5-HETE	2062 ± 770	999 ± 344	48	5187 ± 3505	2020 ± 1037	39
	5-HEPE	247 ± 110	93 ± 25	38	387 ± 248	145 ± 55	37
	t-LTB <sub>4</sub>	422 ± 162	209 ± 82	49	832 ± 253	272 ± 33	33
	LTB <sub>4</sub>	203 ± 72	93 ± 27	46	502 ± 121	156 ± 22	31
	5S,6R-diHETE	109 ± 35	42 ± 10	38	293 ± 163	58 ± 17	20
mono/di-hydroxylated FA	14-HDHA	649 ± 228	589 ± 226	91	813 ± 334	793 ± 422	98
	7-HDHA	283 ± 56	247 ± 52	87	283 ± 89	242 ± 80	85
	4-HDHA	38 ± 9	40 ± 12	106	60 ± 19	47 ± 15	78
	15-HETE	8165 ± 2431	6858 ± 2402	84	13,011 ± 2720	11,252 ± 3878	86
	12-HETE	873 ± 314	775 ± 308	89	1325 ± 347	1239 ± 630	93
	5,15-diHETE	1151 ± 559	750 ± 305	65	1992 ± 622	1281 ± 653	64
	15-HEPE	666 ± 130	488 ± 139	73	881 ± 188	692 ± 250	79
	12-HEPE	161 ± 14	102 ± 25	63	184 ± 40	147 ± 63	80
	5,15-diHEPE	62 ± 21	40 ± 14	64	70 ± 21	58 ± 31	83
bioactive SPM	18-HEPE	104 ± 58	22 ± 5	21	49 ± 10	46 ± 9	93
	RvE3	246 ± 107	148 ± 63	60	425 ± 99	260 ± 111	61
	17-HDHA	2858 ± 981	2571 ± 929	90	3843 ± 1572	3685 ± 1470	96
	PDX	6 ± 2	6 ± 2	105	9 ± 3	9 ± 6	103
	MaR1	23 ± 13	21 ± 12	90	25 ± 13	27 ± 18	110
	RvD2	19 ± 11	19 ± 10	97	22 ± 12	23 ± 15	104
	RvD4	7 ± 4	5 ± 3	81	6 ± 3	3 ± 3	55
	RvD5	644 ± 292	544 ± 247	84	915 ± 477	869 ± 616	95
	LXA <sub>4</sub>	20 ± 11	11 ± 7	56	32 ± 12	14 ± 8	43
fatty acids	AA	1141,187 ± 428,470	1289,412 ± 547,782	113	1426,951 ± 506,043	1928,987 ± 715,110	135
	EPA	281,816 ± 161,304	204,199 ± 117,480	72	312,345 ± 196,321	307,073 ± 144,899	98
	DHA	161,749 ± 60,881	194,502 ± 72,730	120	207,852 ± 64,590	260,285 ± 84,685	125

**Effect of Skepinone-L on LM formation in MDM and MDM<sub>A549</sub>.** MDM ( $2 \times 10^6$  cells) in monocultures or in cocultures with  $2 \times 10^6$  A549 cells were treated with IL-4 for 48 hrs in a Boyden chamber. MDM were then separated from A549. The MDM were preincubated for 15 min with 0.3  $\mu$ M Skepinone-L or vehicle (0.1% DMSO) and then challenged with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50) for another 90 min. Released LMs were extracted from the medium and analyzed by UPLC-MS/MS. Data are given in pg per  $2 \times 10^6$  MDM; mean  $\pm$  S.E.M; n = 3.

## Online Resource 3

		A549	A549 <sub>MDM</sub>	HT-29	HT-29 <sub>MDM</sub>	HUVEC	HUVEC <sub>MDM</sub>
COX	PGE <sub>2</sub>	1206 ± 137	6928 ± 1822	25 ± 9	38 ± 6	447 ± 179	349 ± 58
	PGD <sub>2</sub>	77 ± 10	273 ± 53	-	-	61 ± 27	49 ± 7
	PGF <sub>2α</sub>	910 ± 35	2339 ± 456	26 ± 14	31 ± 16	9229 ± 3157	8873 ± 1437
	TXB <sub>2</sub>	2911 ± 113	6894 ± 1299	88 ± 29	88 ± 14	434 ± 197	423 ± 87

**Formation of COX products in *E. coli*-stimulated cancer cells (A549, HT-29) or HUVEC after monoculture or coculture with MDM.** Cancer cells or HUVEC ( $2 \times 10^6$  cells) were co-cultured for 48 hrs with  $2 \times 10^6$  MDM in the presence of 20 ng/ml IL-4 in a Boyden chamber (see Fig. 1a). Afterwards, cancer cells or HUVEC were separated from MDM and challenged with *E. coli* (O6:K2:H1; ratio = 1:50) for 90 min to induce LM production. LM were isolated by SPE and analysed by UPLC-MS/MS. Data are given in pg per  $2 \times 10^6$  cancer cells or HUVEC mean ± SEM; n = 3-4.



**APPENDIX 2: AUTORENBEITRÄGE ZU DEN MANUSKRIP TEN****Manuskript I**

Human macrophages differentially produce specific resolvins or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity, **Nature Communications**, 2018. 9(1): p. 59.

<b>Autor</b>	<b>Art der Beteiligung</b>
Oliver Werz	Konzeption des Projektes. Planung und Durchführung der Lipidmediator (LM) - Studien. Datenanalyse. Schreiben des Manuskriptes.
Jana Gerstmeier	Western Blot basierte Proteinbestimmungen. Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Datenanalyse. Mitwirken bei der Erstellung des Manuskriptes.
Stephania Liberos	Durchflusszytometrie-Analysen. Datenanalyse.
Xavier De la Rosa	Durchführung der LM-Studien und Datenanalyse.
<u>Markus Werner</u>	Planung und Durchführung der Calcium-Imaging-Experimente. Datenanalyse. Mitwirken bei der Erstellung des Manuskriptes.
<b>Relativer Gesamtanteil: 15%</b>	
Paul C. Norris	Planung und Durchführung der LM-Studien. Datenanalyse. Mitwirken bei der Erstellung des Manuskriptes.
Nan Chiang	Planung der LM-Studien. Datenanalyse. Mitwirken bei der Erstellung des Manuskriptes.
Charles N. Serhan	Konzeption des Projektes. Schreiben des Manuskriptes.

**Manuskript II**

Targeting biosynthetic networks of the proinflammatory and proresolving lipid metabolome, **FASEB Journal**, 2019. 33(5): p. 6140-6153.

<b>Autor</b>	<b>Art der Beteiligung</b>
<u>Markus Werner</u>	Etablierung der UPLC-MS/MS-Analytik. Durchführung der Inhibitorstudien für Ibuprofen, Celecoxib, Zileuton und RSC-3388. Erstellung der Korrelationsanalysen. Weitere Datenanalyse: Mitwirken bei der Manuskripterstellung. <b>Relativer Gesamtanteil: 70%</b>
Paul M. Jordan	Durchführung der Inhibitorstudien für 3887, der Calcium-Ionophor-Experimente und der Durchflusszytometrie-Analysen. Datenanalyse.
Erik Romp	Inhibitorstudien für MK886 und Diflupolol. Datenanalyse.
Anna Czapka	Western Blot basierte Proteinbestimmungen. Datenanalyse.
Zhigang Rao	Western Blot basierte Proteinbestimmungen. Datenanalyse.
Christian Kretzer	Western Blot basierte Proteinbestimmungen. Datenanalyse.
Andreas Koeberle	Mitwirken bei der Etablierung der UPLC-MS/MS-Analytik und der Erstellung des Manuskriptes.
Ulrike Garscha	Konzeption des Projektes. Mitwirken bei der Erstellung des Manuskriptes.
Simona Pace	Datenanalyse. Mitwirken bei der Manuskripterstellung.
Hans-Erik Claesson	Bereitstellung des Inhibitors 3887. Mitwirken bei der Konzeption und dem Schreiben des Manuskriptes.
Charles N. Serhan	Konzeption des Projektes. Mitwirken beim Schreiben des Manuskriptes.
Oliver Werz	Konzeption des Projektes. Schreiben des Manuskriptes.
Jana Gerstmeier	Konzeption des Projektes. Datenanalyse. Schreiben des Manuskriptes.

**Manuskript III**

Communication between human macrophages and epithelial cancer cell lines dictates lipid mediator biosynthesis, **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2020 (published online)

<b>Autor</b>	<b>Art der Beteiligung</b>
<u>Markus Werner</u>	Experimentelles Design und Durchführung der LM-Analytik, des Großteils der Western Blot basierten Proteinbestimmungen, der Experimente rund um das Calcium- und Immunfluoreszenz-Imaging. Datenanalyse. Mitwirken bei der Erstellung des Manuskriptes. <b>Relativer Gesamtanteil: 75%</b>
Simona Pace	Experimentelles Design. Datenanalyse. Mitwirken bei der Erstellung des Manuskriptes.
Anna Czapka	Western Blot basierte Proteinbestimmungen. Datenanalyse.
Paul M. Jordan	Planung und Durchführung der Durchflusszytometrie-Analysen.
Jana Gerstmeier	Konzeption des Projektes. Mitwirken beim Schreiben des Manuskriptes.
Andreas Koeberle	Konzeption des Projektes. Mitwirken beim Schreiben des Manuskriptes.
Oliver Werz	Konzeption des Projektes. Schreiben des Manuskriptes.

**APPENDIX 3: LISTE DER WISSENSCHAFTLICHEN PUBLIKATIONEN**

14. Werner M, Pace S, Czapka A, Jordan P M, Gerstmeier J, Koeberle A, Werz O, Communication between human macrophages and epithelial cancer cell lines dictates lipid mediator biosynthesis. **Cell Mol Life Sci**, 2020.
13. Jagusch H, Werner M, Werz O, Pohnert G, 15-Hydroperoxy-PGE2 : Intermediate in Mammalian and Algal Prostaglandin Biosynthesis. **Angew Chem Int Ed Engl**, 2019. 58(49): p. 17641-17645.
12. Cirri E, De Decker S, Bilcke G, Werner M, Osuna-Cruz C M, De Veylder L, Vandepoele K, Werz O, Vyverman W, Pohnert G, Associated Bacteria Affect Sexual Reproduction by Altering Gene Expression and Metabolic Processes in a Biofilm Inhabiting Diatom. **Front Microbiol**, 2019. 10: p. 1790.
11. Jagusch H, Werner M, Okuna T, Yokomizo T, Werz O, Pohnert G, An Alternative Pathway to Leukotriene B4 Enantiomers Involving a 1,8-Diol-Forming Reaction of an Algal Oxylin. **Org Lett**, 2019. 21(12): p. 4667-4670.
10. Werner M, Jordan P M, Romp E, Czapka A, Rao Z, Kretzer C, Koeberle A, Garscha U, Pace S, Claesson H E, Serhan C N, Werz O, Gerstmeier J, Targeting biosynthetic networks of the proinflammatory and proresolving lipid metabolome. **FASEB J**, 2019. 33(5): p. 6140-6153.
9. Meyer N, Rettner J, Werner M, Werz O, Pohnert G, Algal Oxylin Mediate the Resistance of Diatoms against Algicidal Bacteria. **Mar Drugs**, 2018. 16(12).
8. Rodrigues T, Werner M, Roth J, da Cruz E H G, Marques M C, Akkapeddi P, Lobo S A, Koeberle A, Corzana F, da Silva Júnior E N, Werz O, Bernardes G J L, Machine intelligence decrypts beta-lapachone as an allosteric 5-lipoxygenase inhibitor. **Chem Sci**, 2018. 9(34): p. 6899-6903.
7. Cheung S Y, Werner M, Esposito L, Troisi F, Cantone V, Liening S, König S, Gerstmeier J, Koeberle A, Bilancia R, Rizza R, Rossi A, Roviezzo F, Temml V, Schuster D, Stuppner H, Schubert-Zsilavecz M, Werz O, Hanke T, Pace S, Discovery of a benzenesulfonamide-based dual inhibitor of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase that favorably modulates lipid mediator biosynthesis in inflammation. **Eur J Med Chem**, 2018. 156: p. 815-830.
6. Rettner J, Werner M, Meyer N, Werz O, Pohnert G, Survey of the C20 and C22 oxylin family in marine diatoms. **Tetrahedron Letters**, 2018. 59(9): p. 828-831.

5. Werz O, Gerstmeier J, Libreros S, De la Rosa X, Werner M, Norris P C, Chiang N, Serhan C N, Human macrophages differentially produce specific resolvins or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. **Nat Commun**, 2018. 9(1): p. 59.
4. Lopatriello A, Previtera R, Pace S, Werner M, Rubino L, Werz O, Taglialatela-Scafati O, Forino M, NMR-based identification of the major bioactive molecules from an Italian cultivar of *Lycium barbarum*. **Phytochemistry**, 2017. 144: p. 52-57.
3. Garscha U, Romp E, Pace S, Rossi A, Temml V, Schuster D, König S, Gerstmeier J, Liening S, Werner M, Atze H, Wittmann S, Weinigel C, Rummeler S, Scriba G K, Sautebin L, Werz O, Pharmacological profile and efficiency in vivo of diflapolin, the first dual inhibitor of 5-lipoxygenase-activating protein and soluble epoxide hydrolase. **Sci Rep**, 2017. 7(1): p. 9398.
2. Forino M, Pace S, Chianese G, Santagostini L, Werner M, Weinigel C, Rummeler S, Fico G, Werz O, Taglialatela-Scafati O, Humudifucol and Bioactive Prenylated Polyphenols from Hops (*Humulus lupulus* cv. "Cascade"). **J Nat Prod**, 2016. 79(3): p. 590-7.
1. Rossi A., Pace S, Tedesco F, Pagano E, Guerra G, Troisi F, Werner M, Roviezzo F, Zjawiony J K, Werz O, Izzo A A, Capasso R, The hallucinogenic diterpene salvinorin A inhibits leukotriene synthesis in experimental models of inflammation. **Pharmacol Res**, 2016. 106: p. 64-71.